

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra antropologie a genetiky člověka



Bc. Alžběta Zinková

ÚLOHA MONOCYTŮ A NESPECIFICKÉ IMUNITY V DIABETU

Role of peripheral blood monocytes and innate immunity in diabetes

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitelka: RNDr. Pavlína Čejková, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci „Úloha monocytů a nespecifické imunity v diabetu“ vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Pavlína Čejkové, Ph.D., s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou v práci citovány a uvedeny v seznamu použité literatury na konci práce. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 8. 2013

Alžběta Zinková

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Pavlíně Čejkové, Ph.D. za čas, který věnovala přípravě experimentů i mojí diplomové práci, za její odborné vedení a cenné připomínky, dále bych ráda poděkovala kolektivu laboratoře Molekulární antropologie za milou společnost, Bc. Táně Svitálkové za spolupráci při získávání biologického materiálu, dárcům, kteří nám darovali krev a své kamarádce Mgr. Ivě Němečkové za vše, co pro mě udělala. V neposlední řadě děkuji všem svým blízkým za pochopení a podporu při studiu.

Obsah

1. Úvod.....	10
1.1 Diabetes mellitus.....	10
1.1.1 Slivka břišní – pankreas.....	10
1.1.2 Inzulín a mechanismus jeho působení na buňky	11
1.1.3 Diabetes mellitus 1. typu	11
1.1.4 Latentní autoimunitní diabetes dospělých	14
1.1.5 Diabetes mellitus 2. typu	15
1.1.6 Role vrozené imunity v patogenezi diabetu.....	16
1.2 Monocyty	18
1.2.1 Klasické monocyty	19
1.2.2 Přechodné monocyty.....	20
1.2.3 Neklasické monocyty.....	21
1.3 Toll-like receptory.....	23
1.3.1 Signální dráhy TLR2 a TLR4	25
1.3.2 TLRs a diabetes mellitus.....	27
1.4 Prolaktin.....	29
1.4.1 Hypofyzární prolaktin.....	29
1.4.2 Mimohypofyzární prolaktin	30
1.4.3 Prolaktinový receptor.....	31
1.4.4 Prolaktin a autoimunita	32
2. Hypotézy a cíle diplomové práce.....	34
3. Materiál a metody	36
3.1 Pacienti.....	36
3.2 Kontroly	37
3.3 Studium genové exprese na úrovni mRNA	38
3.3.1 Imunomagnetická separace monocytů.....	38
3.3.2 Izolace RNA	39
3.3.3 Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce.....	41
3.3.4 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-Time PCR).....	42
3.4 Analýza buněk průtokovou cytometrií.....	45
3.4.1 Izolace mononukleárních buněk z plné krve	45
3.4.2 Značení buněk protilátkami a analýza na průtokovém cytometru	47
3.5 Statistické zpracování	48

3.6 Optimalizace pro stimulace monocytů – <i>in vitro</i> studie funkce mimohypofyzárního prolaktinu	48
3.6.1 Kultivace a stimulace monocytů.....	49
4. Výsledky	52
4.1 Studium genové exprese na úrovni mRNA	52
4.1.1 Exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 v monocytech periferní krve odebrané do Vacuette® K3 EDTA a v monocytech z buffy coatů	52
4.1.2 Změny exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 u monocytů diabetických pacientů a kontrol.....	54
4.2 Analýza buněk průtokovou cytometrií.....	57
4.2.1 Porovnání počtu monocytů mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrol ...	58
4.2.2 Porovnání počtu CD14++ buněk a jejich míry fluorescence CD14 antigenu mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrol	60
4.2.3 Porovnání počtu CD14+ buněk a jejich míry fluorescence CD14 antigenu mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrol	64
4.2.4 Porovnání míry fluorescence antigenu u TLR2 a TLR4 pozitivních buněk mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrol	68
4.3 Optimalizace <i>in vitro</i> kultivací – vliv délky doby „uklidňování“ monocytů na jejich stimulaci.....	70
4.3.1 Optimalizace <i>in vitro</i> kultivací – vliv množství LPS na stimulaci monocytů	70
5. Diskuze	74
6. Závěr	81
7. Seznam použitých zkratk	82
8. Seznam použité literatury	85

Abstrakt

Úvod: Diabetes mellitus je polygenní onemocnění, na jehož vzniku se určitou měrou podílí i environmentální faktory. Vrozená imunita spouští nespecificky první obranné reakce po proniknutí patogenu do organismu, zároveň však nadměrná stimulace složek vrozené imunity může zapříčinit vznik autoimunitních onemocnění, mezi které patří i diabetes 1. typu. Složkami vrozené imunity jsou kromě jiných i Toll-like receptory (TLRs) patřící do skupiny struktur rozeznávajících konzervované molekulární struktury charakteristické pro patogeny. Toll-like receptory jsou hojně exprimovány monocyty, které produkují prolaktin (PRL) mající imunostimulační funkci. Pro objasnění role přirozené imunity v patogenezi diabetu jsme sledovali expresi mRNA i proteinu TLR2 a TLR4. Expresi PRL jsme sledovali pouze na úrovni mRNA. Monocyty jsme pomocí průtokové cytometrie rozdělili na klasické (CD14++) a neklasické (CD14+) a sledovali jejich procentuální zastoupení a míru exprese CD14 antigenu na jejich povrchu. Dílčím cílem této diplomové práce byla optimalizace stimulací monocytů pro plánovanou studii funkce mimohypofyzárního prolaktinu in vitro a určení vhodnosti využití buffy coatů zdravých dárců jako zdravé kontroly.

Materiál a metody: Pro sledování exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 bylo do studie zahrnuto 30 pacientů s autoimunitním diabetem (AD), 16 s diabetem 2. typu (T2D), 25 nediabetických pacientů (nonDM), 25 buffy coatů a 24 zdravých kontrol zpracovaných metodou Real Time PCR s PGK1 jako endogenní kontrolou. Na detekci povrchových proteinů bylo zpracováno 19 AD, 8 T2D, 6 nonDM pacientů a 24 zdravých kontrol. Buffy coaty uvedé výše byly použity pouze pro studii porovnání exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 buffy coatů a zdravých kontrol. Pro optimalizační pokusy byly prezentovány výsledky získané zpracováním plné krve od 5 zdravých jedinců.

Výsledky: Pacienti s AD vykazovali zvýšenou expresi mRNA TLR2 oproti zdravým kontrolám, na úrovni proteinu však nebyl tento jev pozorován. Expresi mRNA TLR4 nebyla zvýšena u AD pacientů oproti kontrolám, a to ani na úrovni proteinu, kde byla dokonce oproti kontrolám nižší. U pacientů s AD nedošlo ke zvýšení exprese mRNA PRL oproti zdravým kontrolám. Pacienti s AD mají oproti zdravým kontrolám méně CD14++ i CD14+ buněk, ale na jejich povrchu bylo detekováno více CD14 molekul než u zdravých kontrol. Expresi všech sledovaných markerů se lišila u skupiny buffy coatů zdravých dárců krve a zdravých jedinců odebraných standardním způsobem do systému Vacuette®.

Závěr: Ačkoli jsou TLRs důležitou složkou vrozené imunity, v rámci naší studie nebyly zaznamenány zásadní rozdíly v expresi mRNA ani proteinu v monocytech AD pacientů a zdravých kontrol. Snížené počty CD14⁺⁺ a CD14⁺ monocytů u AD a T2D pacientů a naopak významně vyšší exprese CD14 proteinu u těchto skupin oproti kontrolám značí, že právě monocyty by mohly hrát důležitou roli v patogenezi diabetu. Porovnáním exprese mRNA buffy coatů zdravých dárců krve a zdravých kontrol jsme zjistili signifikantní rozdíly v expresi PRL, TLR2 a TLR4, a proto se domníváme, že není vhodné použití buffy coatů jako zdravých kontrol.

Klíčová slova: diabetes, monocyty, vrozená imunita, Toll-like receptory, prolaktin

Abstract

Introduction: Diabetes mellitus is a polygenic disease and its development is influenced to some extent by environmental factors as well. Innate immunity triggers nonspecifically first defense reactions after penetration of the pathogen into the body, while overstimulation components of innate immunity may give rise to autoimmune diseases, including diabetes type 1. The components of innate immunity are, among others, Toll-like receptors (TLRs) belonging to a group of the structures recognizing preserved molecular structures characteristic of pathogens. Toll-like receptors are abundantly expressed by monocytes which produce prolactin (PRL) having an immunostimulatory function. To clarify the role of innate immunity in the pathogenesis of diabetes, we focused on the expression of mRNA and protein expression of TLR2 and TLR4. The expression of PRL was studied only at the level of mRNA. Monocytes were separated by flow cytometry into classical (CD14++) and nonclassical (CD14+). We monitored their percentages and the degree of expression of CD14 antigen on their surface. The operational objective of this dissertation was to optimize the stimulation of monocytes for the planned study of the function of non-pituitary prolactin in vitro and determine the appropriateness of the use of healthy donors' buffy coats as healthy controls.

Material and Methods: In the study there were included 30 patients with autoimmune diabetes (AD), 16 with diabetes type 2 (T2D), 25 non-diabetic patients (nonDM), 25 buffy coats and 24 healthy controls which were analyzed by Real Time PCR with PGK1 as endogenous control to monitor mRNA expression of PRL, TLR2 and TLR4. For the detection of surface proteins 19 AD, 8 T2D, 6 nonDM patients and 24 healthy controls were processed. Buffy Coats mentioned above were used only for the study comparing mRNA expression of PRL, TLR2 and TLR4 buffy coats and healthy controls. For optimization experiments results obtained by processing whole blood from five healthy individuals were presented.

Results: Patients with AD showed increased mRNA expression of TLR2 compared with healthy controls, as for the protein this phenomenon was not observed. TLR4 mRNA expression was not increased both in AD patients compared to controls and even at the level of protein, which was even lower compared to controls. There was no increase in expression mRNA of PRL in patients with AD compared to healthy controls. Patients with AD in comparison with healthy controls have fewer CD14++ and CD14+ cells, but on their

surface more CD14 molecules were detected than in healthy controls. Expression of all studied markers differed in a group of buffy coats of healthy blood donors and healthy individuals collected in the standard way in the system Vacuette ®.

Conclusion: Although the TLRs are important components of innate immunity in the framework of this study neither significant differences in the expression of mRNA nor protein in monocytes AD patients and healthy controls were observed. Decreased numbers of CD14++ and CD14 + monocytes in AD and T2D patients and vice versa significantly higher expression of CD14 protein in these groups compared to controls indicates that just monocytes could play an important role in the pathogenesis of diabetes. By comparing the mRNA expression of buffy coats of healthy blood donors and healthy controls we found significant differences in the expression of PRL, TLR2 and TLR4, and therefore we think that it is inappropriate to use buffy coats as healthy controls.

Key words: diabetes, monocytes, innate immunity, Toll-like receptors, prolactin

1. Úvod

1.1 Diabetes mellitus

Onemocnění nazývané diabetes mellitus (DM), v češtině též cukrovka, se vyznačuje především hyperglykemií bez ohledu na etiologii jednotlivých typů onemocnění, která při dlouhodobém působení způsobuje patologickou glykosylaci proteinů (Průša, 2006). Se zvýšením hladiny krevního cukru přímo souvisí glykosurie neboli přítomnost glukózy v moči (Anděl et al., 2001). Právě nález glykosurie u pacienta vede k prvotní diagnóze diabetu. Jedná se však pouze o orientační vyšetření, protože i u pacienta, který diabetem netrpí, se může vyskytovat glykosurie způsobená mutací genu *SLC5A2* kódujícího sodno-glukózový kotransportér 2 (Santer et al., 2003). Stejně tak jako u nemocného pacienta nemusí být zkouška na glykosurii pozitivní (Ferrannini, 2011).

DM je skupina metabolických onemocnění projevující se hyperglykemií vyplývající z poruch sekrece inzulínu, jeho struktury nebo obojího. Chronická hyperglykémie vznikající při neléčeném či špatně léčeném diabetu je spojena s dlouhodobým poškozením, dysfunkcí a selháním orgánů. Zejména očí, ledvin, nervů, srdce a cévního systému (American Diabetes Association, 2012).

Ať už se jedná o jakýkoli typ diabetu, k jeho propuknutí je potřeba nejen vnějších vlivů, ale neméně důležité je i genetické pozadí jedince. Poměr vlivu těchto dvou složek se u různých typů diabetu diametrálně liší.

1.1.1 Slinivka břišní – pankreas

Slinivka břišní je žláza s obojím typem sekrece – vnitřním i vnějším. Vnější sekrecí je vylučována pankreatická šťáva obsahující trávicí enzymy do oblasti dvanáctníku. Této funkci je věnována většina jejího objemu; buňky s endokrinní sekrecí tvoří přibližně jen 1,5 % (Čihák, 2002).

Tyto endokrinně aktivní buňky se shlukují do struktur, které jsou nazývány Langerhansovy ostrůvky po jejich objeviteli Paulovi Langerhansovi, který je roku 1869 popsal. Pankreas zdravého dospělého jedince obsahuje přibližně 1 milion ostrůvků, přičemž každý z těchto ostrůvků je tvořen přibližně třemi tisíci endokrinně aktivních buněk. Těmito buňkami jsou β -buňky tvořící inzulín, α -buňky tvořící glukagon, δ -buňky tvořící somatostatin a PP-buňky tvořící pankreatický polypeptid (Anděl et al., 2001).

1.1.2 Inzulín a mechanismus jeho působení na buňky

Gen pro inzulín (*INS*) se nachází na krátkém raménku 11. chromozomu (11p15.5) (Dean and McEntyre, 2004). Jeho exprese je zajišťována výhradně β -buňkami nacházející se v centrální části Langerhansových ostrůvků. Periferní části těchto ostrůvků pak tvoří α -buňky a δ -buňky (Anděl et al., 2001). Sekrece inzulínu je přímo závislá na hladině glukózy v krvi, která se do β -buněk dostává glukózovým transportérem typu 2 (GLUT2).

Po navázání transkripčních faktorů dochází k přepisu *INS* genu vzniká primární transkript skládající se ze tří exonů a dvou intronů, translací finální mRNA vzniká preproinzulín, protein tvořený 110 aminokyselinami. Tento primární translační produkt je neaktivní a na N-konci označen signální sekvencí 24 aminokyselin (AMK) pro transmembránový přenos. Po transportu do endoplazmatického retikula je tato sekvence odštěpena proteázami, čímž vzniká proinzulín. Ten se skládá ze tří domén: B řetězce (N-koncová část), A řetězce (C-koncová část) a C-peptidu spojujícího oba tyto řetězce. Proinzulín je dále zpracován v Golgiho aparátu, kde je obalen exportním váčkem. Zde dochází k finálním úpravám, kdy je z proinzulínové molekuly dalšími proteázami vyštěpen C-peptidový úsek. Tím vzniká již aktivní inzulín. Tyto sekreční váčky se hromadí v cytoplazmě β -buněk a po spuštění signálu jsou secernovány a inzulín i volný C-peptid se dostávají do portálního oběhu (Dean and McEntyre, 2004).

Inzulín jakožto peptidický hormon působí na cílové buňky prostřednictvím inzulínových receptorů na jejich povrchu. Každý inzulínový receptor se skládá ze dvou extracelulárních α podjednotek a dvou transmembránových β podjednotek. Vazba inzulínu na α podjednotku působí konformační změnu, která se přenáší na β podjednotku a způsobuje její autofosforylaci a dále fosforylaci další proteinů kaskády. Výsledkem je zvýšení aktivity glukózového transportéru 4 (GLUT4), kterým glukóza z krevního řečiště efektivněji vstupuje do buňky (Kršek, 2011). Mezi tyto buňky patří svalové nebo tukové buňky. Mezi buňky, jejichž příjem glukózy není závislý na inzulínu, patří červené krvinky, jaterní, střevní, ledvinové a nervové buňky (Dean and McEntyre, 2004).

1.1.3 Diabetes mellitus 1. typu

Diabetem 1. typu (T1D) v ČR trpí kolem necelých 7 % pacientů z celkového počtu všech diabetiků (Zvolský, 2013). V roce 2012 se s tímto typem diabetu léčilo v celé České republice 56 514 osob. Z toho 1 071 pacientů bylo ve věku 0 – 14 let a 895 pacientů ve věku 15 – 19 let (Zvolský, 2013). K propuknutí T1D dochází právě nejčastěji v dětském

věku. Jedním ze spouštěcích faktorů může být u geneticky predisponovaných jedinců infekční virové onemocnění (Szopa et al., 1993; Atkinson et al., 1994; Stern et al., 1994; Coppieters and von Herrath, 2013).

T1D je multifaktoriální autoimunitní onemocnění, při kterém dochází k destrukci β -buněk pacienta produkujících inzulin jeho vlastním imunitním systémem. Autoimunitní diabetes je charakterizován inzulin-dependentní léčbou z důvodů velmi nízké až zcela chybějící hladiny inzulinu v organismu manifestované nízkou či nedetekovatelnou hladinou C-peptidu v plazmě (Tisch and McDevitt, 1996; American Diabetes Association, 2012). Rozeznání specifických povrchových antigenů β -buněk je zprostředkováno pomocnými T-lymfocyty typu 1 (Th1) (Tisch and McDevitt, 1996). K zánětlivé reakci dochází infiltrací mononukleárních buněk mezi β -buňky, nejčastěji to jsou cytotoxické/supresorové T-lymfocyty a aktivované T-lymfocyty. Přítomnost těchto buněk společně s pronikáním IgG do cytoplazmy β -buněk a lokálním ukládáním komplementu způsobuje autoimunitní zánět (Anděl et al., 2001).

V roce 1983 byla publikována práce, kde autoři dokazují přítomnost protilátek proti inzulinu (IAA) u diabetických dětí, u kterých nebyla ještě zahájena léčba inzulinem, což je považováno za imunitní marker poškození β -buněk (Palmer et al., 1983). Dalšími autoprotiilátkami, které způsobují autoimunitní zánět a zároveň jsou i diagnostickými markery, jsou protilátky proti ostrůvkům (ICAs), proti dekarboxyláze kyseliny glutamové (GAD) a proti tyrosinfosfatáze (IA-2, IA-2b) (American Diabetes Association, 2012). Kromě autoantigenů lze detekovat i anti-idiotypické protilátky (anti-Id). Ve zdravém organismu se po určité době ustanoví po disrupci opět rovnováha mezi „klasickými“ protilátkami a anti-Id pomocí regulačních mechanismů. U některých autoimunitních chorob je úroveň autoprotiilátek vyšší než jejich příslušných anti-Id, což ukazuje na trvalé poruchy v humorální idiotypové síti (Larsson et al., 2013).

Geneticky je T1D nejčastěji asociován s polymorfismem HLA antigenů II. třídy. Ty nalezneme na krátkém raménku 6. chromozomu (6p21.3) (NCBI, 2013 a). HLA antigeny II. třídy se nacházejí na antigen prezentujících buňkách (APC), kterými jsou monocyty, makrofágy, B-lymfocyty a dendritické buňky. Funkcí HLA antigenů II. třídy je prezentace cizích antigenů T-lymfocytům. Pokud HLA antigeny II. třídy prezentují vlastní antigeny, dochází k destrukci buněk označených příslušnými antigeny, čímž vzniká případná patologie. Každý HLA antigen II. třídy je tvořen jedním α a jedním β řetězcem. Tento dimerický komplex vzniká v endoplazmatickém retikulu, kde je opatřen ještě

invariantním řetězcem, který zabraňuje navázání peptidů v endoplazmatickém retikulu. Tyto váčky postupují přes Golgiho aparát dále do cytoplazmy, kde fúzí s endozomy vznikajícími endocytózou proteinů zachycených na povrchu APC. Po fúzi váčku s inaktivním HLA antigenem II. třídy a endozomu s peptidovými fragmenty dochází k proteolytickému štěpení invariantního řetězce a k navázání peptidových fragmentů do vazebného místa HLA antigenu II. třídy. Exocytózou se tento komplex dostává na povrch APC (Hořejší and Bartůňková, 2009).

HLA typizace není optimální screeningovou metodou, protože se jedná pouze o predisponující faktor. Nicméně je vhodná pro určení míry rizika pro příbuzné prvního stupně T1D probanda (Pietropaolo et al., 2012). Polymorfismus HLA antigenů II. třídy ovlivňuje schopnost akceptovat a prezentovat antigen prezentujícími buňkami autoantigeny odvozené z β -buněk (Anděl et al., 2001). Predisponujícími genotypy jsou HLA DR3/DQ2 a HLA DR4/DQ8, konkrétně alely DQA1*0501-DQB1*0201 a DQA1*0301-DQB1*0302 (Van der Auwera et al., 1995; Eisenbarth, 2007). K protektivním alelám naopak patří DQB1*0602 (Pugliese et al., 1999), DRB1*0403 (Van der Auwera et al., 1995), DQB1*0301, DQB1*0503, DQB1*0603, DQA1*01 a DQA1*02 (Cinek et al., 2001). HLA-DR4 je často asociována také s dalším autoimunitním onemocněním, revmatoidní artritidou (Stastny et al., 1988).

Klíčovým místem HLA DQ β řetězce určujícím citlivost nebo odolnost vůči T1D je AMK na 57. pozici primární struktury proteinu. Pokud je translatována na této pozici AMK bez náboje (serin, alanin nebo valin), je tento jedinec silněji predisponován k propuknutí onemocnění. Tato míra rizika se zvyšuje s výskytem predisponujících alel na obou chromozomech (Todd et al., 1987). Výskyt kyseliny asparagové na této pozici má naopak protektivní účinky (Tisch and McDevitt, 1996).

Predisponujícím faktorem kromě polymorfismu HLA antigenů II. třídy jsou také počty tandemově opakovaných repetitivních sekvencí (VNTR) v upstream regulační sekvenci genu pro inzulin. Počet opakování 26-36 VNTR je považován za rizikový, zatímco počty 140-200 VNTR jsou silně protektivní (Lucassen et al., 1993). Další mutace *INS* genu a jeho receptoru jsou poměrně vzácné a způsobují oproti majoritním mutacím zanedbatelný počet onemocnění (Průša, 2006).

Gen pro cytotoxický T-lymfocytární antigen 4 (*CTLA-4*) nacházející se na dlouhém raménku 2. chromozomu (2q33) kóduje protein přenášející inhibiční signál na T-lymfocyty. Mutace tohoto genu jsou spojeny s T1D, Gravesovou chorobou,

Hashimotovým onemocněním a orbitopatiemi souvisejícími s onemocněními štítné žlázy, s celiakií, systémovým lupusem a dalšími autoimunitními onemocněními (NCBI, 2013 b). U T1D pacientů je pozorována snížená periferní stimulace T-lymfocytů přes TCR/CD3 proteiny oproti zdravé kontrolní skupině. U těchto hyporesponzivních buněk byla zaznamenána pozitivní korelace s omezeným množstvím lymfocyt-specifické protein tyrozin kinázy p56 ($p56^{lck}$) v klidových T-lymfocytech. Právě abnormální exprese $p56^{lck}$ může být zodpovědná za defektní TCR/CD3 aktivaci T-lymfocytů u T1D pacientů (Nervi et al., 2000).

Mezi vnější faktory ovlivňující vznik onemocnění patří virové nákazy i časné zavedení kravského mléka do diety. Proto by nemělo být dítě takto přikrmováno před 3. měsícem života kravským mlékem, aby byl co nejvíce eliminován tento diabetogenní efekt (Wasmuth and Kolb, 2000). Virové nákazy mohou působit destrukci β -buněk přímo nebo nepřímo přes aktivaci imunitního systému a vznik autoimunitního zánětu. Mezi tyto viry patří virus příušnic, virus zarděnek (Ramondetti et al., 2012), virus Cocksackie B a další enteroviry (Drescher et al., 2004; Tracy et al., 2011), cytomegalovirus a virus Epstein-Barrové (Barzilai et al., 2007).

Kromě genetických a vnějších faktorů nelze u patogeneze T1D vyloučit ani epigenetické faktory a to např. metylaci CpG v promotorové oblasti *INS* genu. U T1D pacientů byla prokázána nižší metylace CpG -19, -135 a -234 oproti kontrolám. Naopak v CpG -130 byla metylace zvýšená oproti kontrolám. V CpG -69, -102 a -206 pak byla metylace srovnatelná u obou pozorovaných skupin (Fradin et al., 2012).

1.1.4 Latentní autoimunitní diabetes dospělých

Latentní autoimunitní diabetes dospělých (LADA) byl dlouhou dobu zaměňován díky nástupu v pozdním věku s T2D. Pokrok molekulárních technik nám ale dnes umožňuje na základě biochemické a imunologické analýzy oba typy od sebe bezpečně odlišit. LADA patří díky autoimunitnímu zánětu a destrukci β -buněk do skupiny inzulin-dependentního diabetu. U LADA pacientů jsou detekovány díky destrukci β -buněk nižší hladiny sérového C-peptidu a naopak vyšší hladiny GAD než u T2D pacientů (Tuomi et al., 1993; Zimmet et al., 1994).

Autoimunitní progresse onemocnění je však pomalejší než u dětských pacientů s T1D. Detekce autoprotiátok GAD je doporučována u všech neobězních pacientů s nástupem nemoci po 30. roce, aby se zabránilo chybné diagnostice a aby byla již

od časného stádia nasazena co nejefektivnější léčba, která by zpomalila progresi onemocnění (Zimmet et al., 1994). Park et al. (2011) uvádí, že pouze u 3 z 36 pacientů musela být během pozorovaného období 36 měsíců zavedena inzulinová léčba. Vyšší titry anti-GAD byly prokázány u všech pacientů, ale pouze u pacientů, kteří si aplikovali inzulin, byly detekovány i další protilátky (IA-2 a ZnT8). To potvrzuje domněnku, že přítomnost anti-GAD nemusí nezbytně vést k inzulin-dependentní léčbě.

1.1.5 Diabetes mellitus 2. typu

Zatímco počty T1D pacientů jsou víceméně konstantní a k nárůstu dochází pouze pozvolna, počty T2D pacientů stoupají mnohem výrazněji. V roce 2012 se v ČR s T2D léčilo 772 585 pacientů. To znamená, že v ČR každý sedmý obyvatel trpí diabetem 2. typu. Počet nemocných žen a mužů je u T1D téměř stejný, u T2D tomu tak není. V roce 2012 bylo registrováno o 44 425 více žen pacientek než mužů. Tento nepoměr lze vysvětlit vyšším průměrným věkem dožití žen v ČR společně s nástupem T2D ve vyšším věku (Zvolský, 2013). Věk při nástupu nemoci se velice liší, ale obecně platí, že nejčastější nástup T2D je mezi 40. - 70. rokem života (Perušičová, 2011). V posledních třech dekádách se v západním světě tento věk rapidně snižuje a v dnešní době trpí T2D i děti a adolescenti, u nichž může být tento typ díky časnému nástupu zaměňován s T1D (Fagot-Campagna et al., 2000; Springer et al., 2013). Rozvoji T2D často předchází prediabetická fáze, kdy je koncentrace glukózy v krvi vyšší než norma, ale nejsou splněny všechny aspekty diagnózy diabetu. To představuje vážné riziko vývoje T2D. Prediabetes je celosvětově mnohem rozšířenější než diabetes a jenom ve Spojených státech amerických tyto příznaky vykazuje 79 miliónů osob (Bergman, 2013).

Zatímco patogeneze T1D je závislá na genetickém pozadí jedince a vnější vlivy pouze spouští onemocnění, u T2D je tomu právě naopak. Životní styl, výživa a environmentální vlivy mají u patogeneze tohoto onemocnění majoritní význam. Ve více než v 90 % případů se jedná o multifaktoriální polygenní onemocnění. Zbývající případy jsou tvořeny monogenním diabetem 2. typu – MODY (maturity onset diabetes of the young) (Anděl et al., 2001).

Rizikovými faktory pro vznik T2D je obezita, sedentární životní styl a špatné jídelní návyky. Tyto vlivy mají za následek propuknutí inzulinové rezistence. Ta vzniká dlouhodobým zvýšením hladiny inzulinu. To vede ke snížení citlivosti buněk a tkání vůči jeho působení. Inzulinová rezistence je úzce spojena se zánětem, který se snaží tělo

eliminovat produkci cytokinů majících vliv na snížení efektivity inzulínového působení. T2D, který je způsobený obezitou, je důsledkem chronického zánětu (Greenberg and McDaniel, 2002; Spranger et al., 2003). Nadprodukce inzulínu vede k přetěžování β -buněk a k jejich vyčerpávání. Při dlouhodobém přetěžování mohou ztratit svou funkci a přestat produkovat inzulín úplně. To je ovšem následek dlouhodobě neléčeného onemocnění, častěji dochází ke snížení produkce inzulínu nebo ke snížení citlivosti inzulínových receptorů. T2D je také nazýván non-dependentní diabetes, protože ve většině případů není tvorba inzulínu zcela inhibována a tudíž nemusí být suplementován. Podle rozsahu poškození je volena i léčba. Léčba T2D je variabilní a závislá na míře postižení. Od diet a změn životního stylu, přes léky podporující výdej či příjem inzulínu až po léčbu samotným inzulínem (Anděl et al., 2001).

Studium genetického pozadí je u onemocnění, jehož diagnóza je postavena na symptomech, velmi obtížná. Neustále jsou nacházeny kandidátní geny malého účinku. Do roku 2006 byly popsány pouze tři takovéto geny: *PPAR γ* (Altshuler et al., 2000), *KCNJ11/ABCC8* (Gloyn et al., 2003) a *TCF7L2* (Grant et al., 2006), kdežto dnes je známo již 70 kandidátních lokusů (Kato, 2013). Tento trend můžeme očekávat i v dalších letech, ale díky komplexitě T2D je velmi málo pravděpodobné, že by byl nalezen jeden gen s majoritním vlivem na patogenezi T2D (Anděl et al., 2001).

Výše popsané neplatí pro typ MODY, kde jsou genetické poruchy známy a k manifestaci diabetu dochází bez ohledu na další faktory. Pro MODY je typická časná manifestace onemocnění, vysoká rodinná zátěž a nízké riziko diabetických komplikací, které jsou pro T2D tak typické (Anděl et al., 2001). Těmito zdravotními komplikacemi T2D jsou nefropatie, retinopatie a tzv. diabetická noha (Zvolský, 2013).

1.1.6 Role vrozené imunity v patogenezi diabetu

Významnou součástí vrozené imunity je řada buněk imunitního systému jako monocyty, makrofágy, antigen prezentující B-buňky, dendritické buňky, ale pravděpodobně také střevní epitelové buňky, endotel, Kupfferovy buňky v játrech, tukové buňky a další. Tyto buňky nesou na svém povrchu pattern recognition receptors (PRRs) neboli struktury rozeznávající konzervované molekulární struktury charakteristické pro patogeny (pathogen-associated molecular patterns – PAMPs). Mezi studované PRRs patří i Toll-like receptory podrobněji popisované v kap. 1.3. Navázání příslušné

molekulární struktury na PPRs vede k aktivaci nukleárního faktoru- κ B (NF- κ B) a produkci zánětlivých cytokinů (Medzhitov, 2001).

Přibývá důkazů, že produkované cytokiny indukující akutní fáze reakce se úzce podílí na patogenezi diabetu 2. typu a přidružených komplikací. Zvýšené cirkulující zánětlivé markery (C-reaktivní protein a interleukin-6) mohou předvídat vývoj T2D. Profylaxi v tomto případě může být podávání léků s protizánětlivými účinky (aspirin, thiazolidindion), které snižují hladiny obou reaktantů akutní fáze i hladinu glykémie (Pickup, 2004; Fernández-Real and Pickup, 2008). Dlouhodobá, cytokiny zprostředkovaná akutní fáze reakce je součástí rozsáhlé vrozené imunitní odpovědi. Působením cytokinů v mozku, játrech, endotelu, tukové tkáni i v jiných částech těla, může tento proces významně přispívat k biochemickým a klinickým rysům metabolického syndromu X (glukózová intolerance, dyslipidemie, inzulinová rezistence, hypertenze, centrální obezita, ateroskleróza) (Pickup and Crook, 1998).

Výskyt spontánního T1D u neobézních diabetických myši (NOD) může být ovlivněn mikrobiálním prostředím v chovném prostředí nebo působením mikrobiálních podnětů, kterými mohou být injekčně podávané mykobakteriální antigeny a další mikrobiální produkty (Calcinaro et al., 2005). Ukazuje se, že specific-pathogen free NOD myši, kterým chybí protein MyD88 (adaptér pro vrozené imunitní receptory rozpoznávající mikrobiální podněty) nevyvíjí T1D. Avšak zdá se, že tento efekt je závislý na komenzálních mikroorganismech, protože MyD88 negativní NOD myši bez komenzálních mikroorganismů vyvíjejí silný diabetes. Dodatečným dodáním těchto mikroorganismů dochází ke zmírnění příznaků a progresi již rozvinutého T1D. Bylo zjištěno, že přítomnost či absence MyD88 adaptérového proteinu indukuje i změnu složení střevní mikroflóry distální části zažívacího traktu. Tyto výsledky naznačují, že interakce střevních mikrobů s vrozeným imunitním systémem je kritickým faktorem modifikujícím T1D predispozice (Wen et al., 2008).

1.2 Monocyty

Monocyty, stejně jako i jiné leukocyty, vznikají z pluripotentních kmenových buněk v kostní dřeni. Vlivem diferenciačních faktorů vznikají dvě základní linie leukocytů – lymfoidní a myeloidní.

Z lymfoidní linie dále diferencují B-lymfocyty, T-lymfocyty a NK buňky. NK buňky jsou vývojově bližší T-lymfocytům než B-lymfocytům a jejich funkcí je rozpoznání a zabíjení virem napadených a nádorových buněk. NK buňky produkují i některé antigeny typické pro T-lymfocyty nebo monocyty/makrofágy. Jedním z těchto antigenů je CD16, který exprimují kromě některých T-lymfocytů a monocytů i neutrofily. Dalším takovým antigenem je CD56, který vytváří kromě NK buněk i aktivované T-lymfocyty (Cooper et al., 2001; Male et al., 2006).

Z myeloidní linie vznikají monocyty a tři druhy granulocytů – neutrofily, bazofily a eozinofily. Procentuální zastoupení jednotlivých druhů leukocytů se liší v závislosti na zdravotním stavu i věku pacienta, v tabulce níže (Tab. 1) je uvedeno přibližné zastoupení jednotlivých druhů leukocytů u zdravého dospělého jedince (Male et al., 2006; Hořejší and Bartůňková, 2009).

Tab.1 Procentuální zastoupení jednotlivých druhů leukocytů u zdravého dospělého jedince

Druh buněk	Poměrné zastoupení (%)
Neutrofilní granulocyty	60-70
Eozinofilní granulocyty	1-3
Bazofilní granulocyty	< 2
Monocyty	5-10
Lymfocyty	20-40

(Převzato z Hořejší and Bartůňková, 2009)

Společně s lymfocyty tvoří monocyty a jim příbuzné buňky skupinu mononukleárních buněk (PBMCs), které lze imunogeneticky od sebe odlišit díky detekci exprese jejich CD znaků (cluster of differentiation). Tyto znaky jsou pro jednotlivé typy buněk specifické. Ne vždy jsou majoritně exprimovány typické znaky a místo nich jsou více exprimovány jinak minoritní nebo neklasické antigeny. Expres těchto povrchových

markerů flexibilně reaguje na změny nastávající uvnitř buňky a následné diferenciační děje (Male et al., 2006; Ziegler-Heitbrock, 2010). V rámci těchto dějů nastává i změna exprese cytokinů, která koreluje s exprimovanými povrchovými markery (Ströher et al., 2001; Ziegler-Heitbrock, 2007, 2010; Geissmann, 2010).

Volně cirkulující monocyty setrvávají v krevním řečišti až několik dní než přecházejí do tkání, kde se mění v tkáňové makrofágy, profesionální fagocytozomy (van Furth and Cohn, 1968). Monocyty/makrofágy jsou efektory a regulátory zánětu a vrozené imunitní odpovědi. Jejich schopnost bezprostřední předprogramované reakce na patogeny je klíčová při primární nespecifické obraně organismu (Geissmann et al., 2010). I v rámci populace monocytů můžeme odlišit 3 typy monocytů: klasické, přechodné a neklasické (Obr. 1). Stejně jako jejich antigenní výbava se liší i jejich prozánětlivé účinky vyvolané cytokiny, které aktivované monocyty produkují (Ziegler-Heitbrock, 2010).

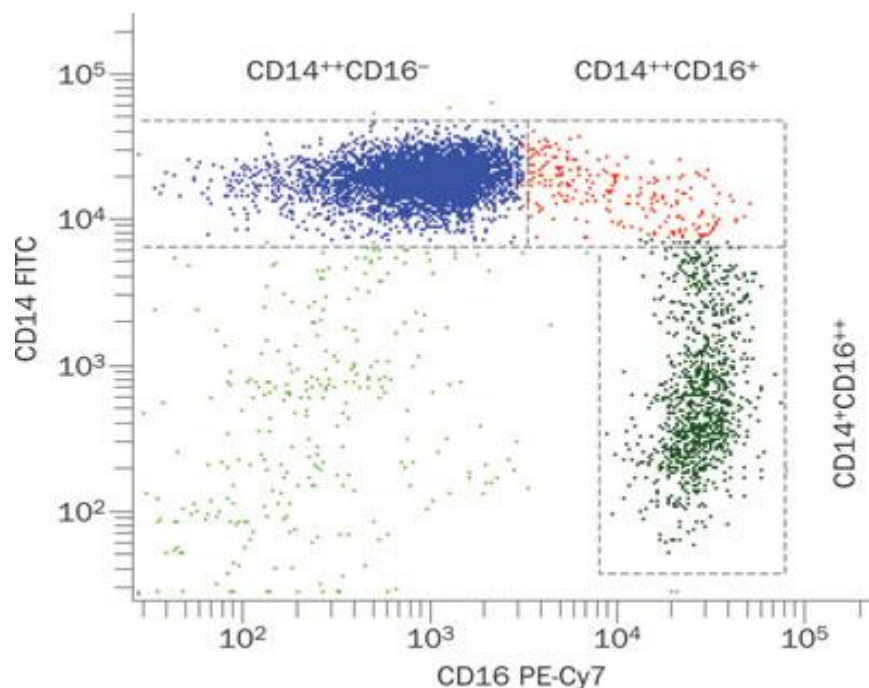
Dendritické buňky (DCs) byly prvně identifikovány v myších lymfoidních orgánech (Steinman and Cohn, 1973). Jejich funkcí je zpracování a prezentace antigenu. Mezi monocyty/makrofágy a dendritickými buňkami je velmi úzký vztah, který není vždy možné přesně určit. Volně cirkulující monocyty mohou diferencovat v DCs (Romani et al., 1994), ale i v krvi cirkulující DCs mohou diferencovat v makrofágy (Robinson et al., 1999).

1.2.1 Klasické monocyty

Monocyty na svém povrchu prezentují mnoho antigenů, jejichž exprese se mezi jednotlivými typy monocytů liší. Proto byly vybrány pro charakterizaci monocytů 2 typické antigeny. Těmito antigeny jsou membránově vázané CD14 a CD16, které jsou fluorescenčně značeny pomocí monoklonálních protilátek a detekovány průtokovou cytometrií (Ziegler-Heitbrock, 2010). CD14 molekuly jsou glykoproteiny, které fungují jako koreceptory Toll-like receptorů (TLRs). Klasické monocyty jsou charakterizovány jako CD14⁺⁺ a CD16⁻ buňky. Mezi další antigeny, které tento typ monocytů tvoří, patří: CD15, CD33, CD43, CD38, CD45Ra, CD62L, CD64, CD163, CCR2, EMR2 a ILT-4 (Ziegler-Heitbrock, 2007).

Navázáním lipopolysacharidu (LPS) na cirkulující LPS-vázající protein a CD14 glykoprotein dochází ke spuštění intracelulární dráhy, což vede k aktivaci NF- κ B a zahájení exprese, syntézy a následně i k uvolnění řady prozánětlivých cytokinů včetně interleukinu-1 (IL-1), interleukinu-6 (IL-6), interleukinu-8 (IL-8) a tumor nekrotizujícího

faktoru- α (TNF- α) (Schletter et al., 1995). Tato reakce by ale nebyla zprostředkovatelná bez TLRs, které mají na rozdíl od CD14 transmembránovou povahu a tím umožňují přenos signálu a indukci uvnitř buňky. CD14 molekuly jsou k buněčnému povrchu připojeny pomocí glycosylphosphatidylinositolové kotvy (GPI-kotva) (Ulevitch and Tobias, 1995).



Obr. 1 Dot-blot zobrazující populace klasických monocyty CD14⁺⁺ CD16⁻ (modře), přechodných monocyty CD14⁺⁺ CD16⁺ (červeně) a neklasických monocyty CD14⁺ CD16⁺⁺ (zeleně); osa x – antiCD16 (PE-Cy7) značení, osa y – antiCD14 (FITC) značení
(Převzato z Heine et al., 2012)

1.2.2 Přechodné monocyty

Pokud monocyty exprimují a na svém povrchu prezentují CD16 molekuly a zároveň jsou silně CD14 pozitivní, hovoříme o přechodných monocitech. Zvýšený výskyt přechodných monocyty byl prokázán u pacientů se zánětlivým onemocněním (Fingerle et al., 1993; Nockher and Scherberich, 1998), jinak je jejich zastoupení na nízké hladině, která se ale zvyšuje při léčbě cytokiny a při zánětu. Ačkoli netvoří velké populace, mají unikátní vlastnosti, pro které mají i v tak malých počtech nezastupitelnou funkci (Skrzeczyńska-Moncznik et al., 2008; Moniuszko et al., 2009).

Tyto CD14⁺⁺ CD16⁺ monocyty jsou charakterizované vyšší expresí HLA

antigenů II. třídy a po stimulaci přes TLRs je u nich detekována i vyšší produkce TNF- α (Szaflarska et al., 2004).

1.2.3 Neklasické monocyty

Zatímco stavba a funkce klasických monocytů jsou hematologům známy již sto let, menší neklasické monocyty (CD14⁺ CD16⁺) byly popsány teprve před dvaceti lety a tvoří přibližně 10 % z celkového počtu monocytů (Ziegler-Heitbrock, 2010). Mezi jednotlivými typy monocytů je úzký vztah, což potvrzuje pozorované zvýšení počtu přechodných monocytů a následně i neklasických monocytů při léčbě kolonie stimulujícím faktorem makrofágů (M-CSF) (Weiner et al., 1994).

Nízkou hladinu exprese CD14 molekul značí někteří autoři CD14⁺ CD16⁺ (Fingerle et al., 1993; Nockher and Scherberich, 1998; Szaflarska et al., 2004; Ziegler-Heitbrock, 2010), jiní je označují jako CD14^{dim} (CD16^{bright}, CD16⁺) monocyty (Emminger et al., 2001; Yoshioka et al., 2002; Cros et al., 2010). Ačkoli cytologické zkoumání potvrdilo morfologickou kompatibilitu CD14⁺ CD16⁺ s monocyty, právě nízká hladina exprese CD14 a odlišná funkce těchto monocytů vedla ke stanovení hypotézy, že se nejedná o monocyty, ale o NK buňky. Tuto hypotézu podporovalo i zjištění, že tyto buňky měly sníženou expresi i dalších typických molekul - CD11b a CD163. Cros et al. (2010) ale stanovili, že CD14⁺ CD16⁺ nejsou lymfoidního původu a tudíž nemohou být NK buňkami.

Funkčně se neklasické monocyty liší od těch klasických i přechodných slabou schopností fagocytózy, dále neprodukují reaktivní formy kyslíku (ROS) a některé cytokiny. To vše je dáno tím, že k reakcím nedochází v důsledku navázání mikrobiálního patogenu na povrchové receptory TLR2 nebo TLR4, ale jsou zprostředkovány vazbou virové nukleové kyseliny na intracelulární TLR7 a TLR8. Navázání vede ke spuštění MyD88-MEK dráhy s následnou produkcí TNF- α , IL-1 β a chemokin (C-C motif) ligand 3 (CCL3). Zdá se tedy, že neklasické monocyty fungují jako lokální dohled vrozené imunity a hrají důležitou roli v patogenezi autoimunitních onemocnění (Cros et al., 2010). Jejich počty se zvyšují stárnutím a při chronických zánětlivých onemocněních (Strauss-Ayali et al., 2007; Ziegler-Heitbrock, 2007).

Počty monocytů byly sledovány u mnoha skupin pacientů s různými typy onemocnění. U diabetiků nebyly pozorovány zvýšené hladiny celkových leukocytů, ale monocytů již ano. Pacienti s diabetickými komplikacemi, měli snížené počty CD16⁺

monocytů oproti těm, kteří diabetické komplikace neměli. Tento stav může pacienty predisponovat právě ke vzniku těchto komplikací. V této studii však nebyli pacienti rozděleni do skupin podle typu diabetu a většinu tvořili T2D pacienti (Min et al., 2012). Tyto a podobné výzkumy komplikuje fakt, že většina pacientů je v těchto studiích diagnostikována již několik let a tudíž zde nejsou pacienti, u kterých právě dochází k destrukci β -buněk vlivem autoimunitního zánětu (Ziegler-Heitbrock, 2007).

1.3 Toll-like receptory

Toll-like receptory (TLRs) představují nedílnou součást prvotní obrany organismu. Po navázání patogenu dochází ke spuštění nespecifické imunitní reakce příslušnými buňkami, která vede k produkci cytokinů způsobujících lokální zánět (Hořejší and Bartůňková, 2009). Ačkoli se jedná o evolučně velmi starý mechanismus obrany savčího organismu, jsou nám TLRs známy méně jak 20 let (Akashi-Takamura and Miyake, 2006). TLRs jsou odvozeny od receptorů Toll nalezených u *Drosophily*, kde řídí dorzoventrální polaritu vyvíjejícího se embrya (Hashimoto et al., 1988). Až později byla nalezena souvislost Toll dráhy s imunitním systémem díky zjištění, že mutanti Toll nemají schopnost bránit se houbové infekci a Gram-pozitivním bakteriím, protože u nich nedochází k produkci peptidu Drosomycinu, který má antifungicidní účinky (Lemaitre et al., 1996). TLRs a jejich signální dráhy zastávají v organismu důležitou funkci v obraně proti infekčním onemocněním, na druhou stranu jejich abnormální aktivita vede ke vzniku alergií, autoimunitních onemocnění nebo aterosklerózy (Takeda et al., 2003; Akashi-Takamura and Miyake, 2006).

Stavbou TLR patří do rodiny transmembránových receptorů 1. typu charakterizovaných extracelulární repetitivní doménou bohatou na leucin (LRR) a intracelulární Toll/IL-1 receptorovou doménou (TIR) (Medzhitov et al., 1997). Nespecifická vazba patogenu je zajišťována polymorfismem LRR umožňují vazbu a následnou reakci na mnoho odlišných proteinových struktur (Kobe and Kajava, 2001). Aktivní doména TLR vázající antigen je pak tvořena těmito LRR a rozsáhlým β -řetězcem ve tvaru podkovy. Tato struktura představuje až 10x větší vazebnou plochu než oblasti vázající protilátky a T-buněčné receptory (Bell et al., 2003).

TLRs můžeme rozdělit do rodin podle toho, jaké typy ligandů na sebe váží. Lipidické struktury na sebe váže TLR2, který v kombinaci s TLR1 nebo TLR6 vytváří heterodimer. Tyto struktury váže i TLR4, ten však tvoří homodimer. Zatímco TLR4 rozeznává LPS, produkt Gram-negativních bakterií, TLR2 váže produkty Gram pozitivních bakterií (např. peptidoglykan) a GPI kotvené parazitární produkty. Virové nebo bakteriální nukleové kyseliny na sebe váží TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9. TLR3 rozeznává dvoušroubovici virové RNA (dsRNA), CpG motiv DNA je rozeznáván TLR9 a flagelin, protein tvořící bakteriální bičík, je vázán na TLR5 (Takeda et al., 2003; Akashi-Takamura and Miyake, 2006). Přehled TLRs a jejich ligandů je uvedeno v tabulce 2.

Tab. 2 Typy lidských TLRs a jejich ligandy

TLR	Ligand
TLR1	Triacyl-lipopeptid
TLR2	Peptidoglykan (Gram+) Lipotechoová kyselina (Gram+) GPI-kotvené proteiny (Trypanosoma) Zymosan (kvasinky) Lipoprotein Atypický LPS (Leptospira) Lipoarabinomannan (Mycobacterium)
TLR3	dsRNA (viry)
TLR4	LPS (Gram-) Fúzní protein (RSV) EDA doména fibronectinu (endogenní) HSP60 (endogenní) Taxol HSP70 Hyaluronan
TLR5	Flagelin
TLR6	Diacyl lipopeptid Zymosan (kvasinky)
TLR7	ssRNA (viry) Imichimod, R848 (syntetický) Loxiribin (syntetický)
TLR8	ssRNA (viry) R848 (syntetický)
TLR9	Nemetylovaná CpG DNA (bakterie) Herpes virus DNA CpG ODNs (syntetický)
TLR10	Nespecifikováno

(Upraveno podle Akashi-Takamura and Miyake, 2006)

TLRs se neliší pouze ligandy, které váží; jejich exprese je tkáňově specifická a odlišují se i výskytem v rámci samotné buňky. Pokud sledujeme expresi TLRs v rámci buňky, tak TLR1, TLR2 a TLR4 se vyskytují na buněčném povrchu, zatímco TLR3, TLR7 a TLR9 se nacházejí intacelulárně (Takeda et al., 2003). Jak již bylo naznačeno, ne všechny buňky produkují všechny TLRs a zdá se, že některé jsou tvořeny pouze určitým typem buněk. Zatímco TLR1 byl exprimován ve všech zkoumaných leukocytech, tak TLR2, TLR4 a TLR5 byly prokázány pouze na buňkách pocházejících z myeloidní linie a TLR3 pouze na dendritických buňkách. Proto je autoři rozdělili do tří skupin. Na všudypřítomné (TLR1), omezeně se vyskytující (TLR2, TLR4, TLR5) a specifické (TLR3) (Muzio et al., 2000).

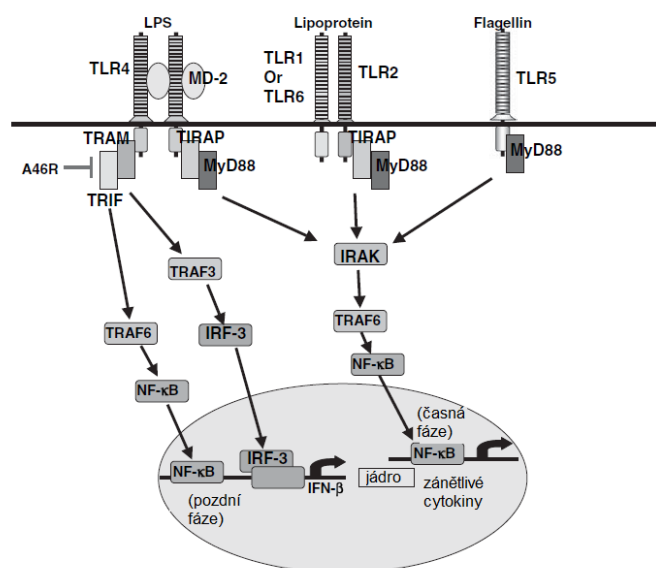
Pro účely naší studie jsme sledovali expresi mRNA i proteinu TLR2 a TLR4.

1.3.1 Signální dráhy TLR2 a TLR4

U savců dochází k aktivaci a spuštění signální dráhy zapojením sady adaptérových molekul, kterými jsou: myeloidní diferenciací faktor 88 (MyD88), TIR, TIRAP/MAL (Fitzgerald et al., 2001), TRIF (Yamamoto et al., 2002), TRAM (Yamamoto et al., 2003), IL-1 receptor asociovaná kináza (IRAK), TNF receptor asociovaný faktor 6 (TRAF6) a faktor 3 (TRAF3) (Oganesyan et al., 2006).

TLR signalizace je tvořena dvěma základními typy drah: MyD88-dependentní a MyD88-independentní/TRIF-dependentní dráhou (McGettrick and O'Neill, 2004). MyD88-dependentní dráha může být spuštěna interakcí se všemi typy TLRs vyjma TLR3. Důsledkem spuštění MyD88-dependentní dráhy je aktivace NF- κ B a zahájení produkce prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-1 β , IL-6 a IL-12). Obecně se předpokládá, že MyD88 signalizace chrání proti náchylnosti k infekčním chorobám a poruchám imunity. Na druhou stranu může nadměrná MyD88 signalizace vyvolávat alergie, autoimunitní onemocnění nebo aterosklerózu.

MyD88-independentní/TRIF-dependentní dráha indukuje opožděnou aktivaci NF- κ B a produkci interferonu (IFN) 1. typu (Akashi-Takamura and Miyake, 2006) (Obr. 2).



Obr. 2 Signalizační kaskády TLR1, 2, 4, 5 a 6 spouštěné po navázání ligandu
(Upraveno podle Akashi-Takamura and Miyake, 2006)

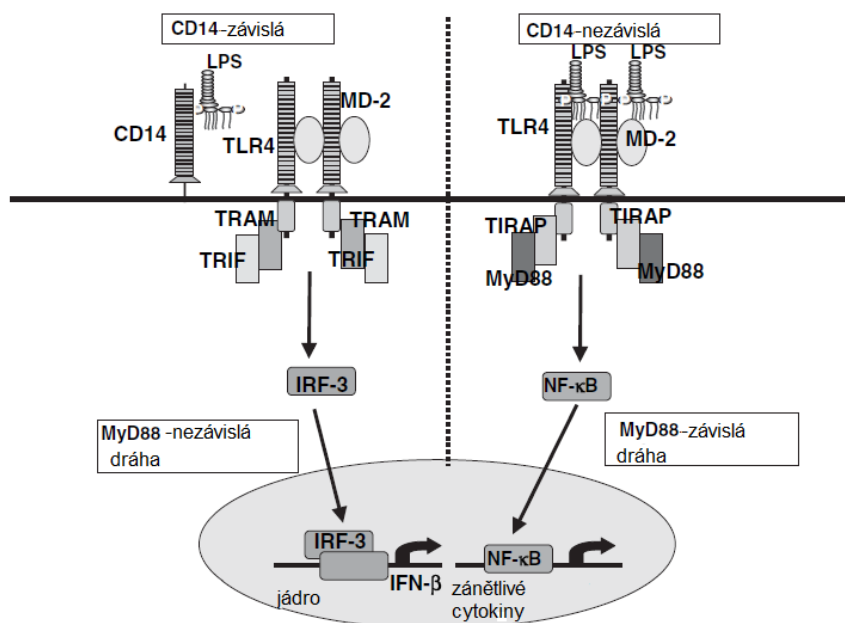
Mnoho TLRs nemůže vázat patogen, pokud není přítomen koreceptor. Těmi jsou pro rozpoznání mikrobiálních antigenů MD-2, CD36 a CD14, pro modulaci následné signální dráhy CD14 a RP105, a pro správnou vezikulární funkci Unc93b1 (Akashi-Takamura and Miyake, 2006).

CD14 je důležitým koreceptorem TLR4. Jedná se o 50 kDa velký, GPI kotvený protein nacházející se na povrchu monocytů nebo také volně v plazmě. Jeho úkolem je vázat LPS a usnadňovat tak následnou signalizaci. I když je detekce LPS možná i bez CD14, přítomnost CD14 je nezbytná pro aktivaci TRAM-TRIF dráhy přes TLR4/MD-2 (Jiang et al., 2005). Tuto dráhu označujeme za CD14-dependentní.

CD14-independentní dráha je zprostředkovávaná MD-2 proteinem o velikosti 25 až 30 kDa, jenž je asociován s extracelulární doménou TLR4. TLR4/MD-2 tvoří komplex rozpoznávající LPS. MD-2 knock-out myši nereagují na LPS (Nagai et al., 2002), což potvrzuje jeho nezastupitelnou funkci pro vazbu a následnou signalizaci (Viriyakosol et al., 2001; Nagai et al., 2002). Další funkcí MD-2 je ovlivnění specifity TLR4 (Akashi et al., 2001) a regulace následného shlukování receptoru (Kobayashi et al., 2006). U septických pacientů se předpokládá, že rozpustný MD-2 proniká do extravaskulárního prostoru, podporuje LPS aktivaci epitelálních buněk exprimujících TLR4 a tím působí

jako mediátor orgánových zánětů (Pugin et al., 2004). MyD88-dependentní a MyD88-independentní signalizační dráhy jsou zobrazeny na obrázku 3.

CD36 působí jako prostředník nebo koreceptor pro diacylglycerid, který je rozeznávaný prostřednictvím TLR2/6 komplexu (Akashi-Takamura and Miyake, 2006).



Obr. 3 CD14-závislá (dependentní) a CD14-nezávislá (independentní) signalizace po navázání LPS

(Upraveno podle Akashi-Takamura and Miyake, 2006)

1.3.2 TLRs a diabetes mellitus

T1D je onemocnění charakterizované zvýšenými hladinami cirkulujících zánětlivých biomarkerů a zvýšením monocytární činnosti. Zánět u T1D pacientů může být zprostředkován částečně prostřednictvím aktivace vrozené imunitní dráhy přes TLRs. U T1D pacientů byla sledována zvýšená exprese TLR2 i TLR4 a to jak na úrovni mRNA, tak i na úrovni proteinu (Devaraj et al., 2008).

Obdobně byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny TLR2 a TLR4 u T2D pacientů. Jedinci s T2D mají nesčetné množství metabolických poruch včetně zvýšených hladin zánětlivých markerů, které zvyšují riziko kardiovaskulárního onemocnění. Opět bylo zvýšení exprese TLR2 a TLR4 pozorováno na úrovni mRNA i proteinu. Množství

TLRs v tomto případě korelovalo s BMI, homeostázním modelem posuzující inzulinovou rezistenci, glukózou a volnými mastnými kyselinami. Tito pacienti vykazovali i zvýšenou expresi MyD88, fosforylovaného IRAK-1, TRIF, TICAM-1, IRF-3 a NF- κ B v monocitech. Dále byly detekovány i zvýšené hladiny cytokinů IL-1 β a IFN- γ . Tento signifikantní rozdíl v expresi ale po adjustaci na BMI zanikl (Dasu et al., 2010).

1.4 Prolaktin

PRL je jedním z adenohypofyzárních hormonů, ale i cytokinem produkovaným nejen buňkami imunitního systému. Ovlivňuje laktaci i chování a zároveň jeho mimohypofyzární výskyt plní důležitou imunomodulační funkci. Ben-Jonathan et al. (1996) uvádí, že PRL plní v organismu více funkcí než všechny hormony hypofýzy dohromady.

Gen pro prolaktin (PRL) se nachází na krátkém raménku 6. chromozomu (6p22.2-p21.3) (NCBI, 2013 c) a je tvořen 5 exony a 4 introny, které jsou dlouhé přibližně 10 kb (Truong et al., 1984; Goffin et al., 1996). PRL je peptidový hormon tvořený 199 aminokyselinami (Li et al., 1969) s molekulovou hmotností 23 kDa (Smith and Norman, 1990). Prehormon je tvořen 227 AMK a po odštěpení 28 AMK dlouhého signálního peptidu vzniká maturovaný PRL (Cooke et al., 1981).

PRL může být posttranslačně modifikován. Zatímco deaminace neovlivňuje jeho biologickou účinnost, glykosylovaný PRL má nižší biologickou účinnost (Freeman et al., 2000) a fosforylovaná forma vykazuje odlišné biologické vlastnosti jakými je například pozorovaný antiangiogenní účinek (Ueda et al., 2006).

Mezi další posttranslační modifikace patří změna velikosti výsledného PRL. Tyto PRL struktury vznikají dimerizací a polymerací PRL nebo jeho agregací s vazebnými proteiny jako jsou např. imunoglobuliny. Typ vazby (kovalentní, nekovalentní) mezi PRL a vazebným proteinem určuje výslednou molekulovou hmotnost formy. Obecně platí, že vysokomolekulové formy PRL mají sníženou biologickou aktivitu (Sinha, 1995).

1.4.1 Hypofyzární prolaktin

Hypofyzární PRL působí na cílové buňky klasickou endokrinní cestou. Z adenohypofýzy, kde je PRL skladován v sekrečních váčcích, se uvolňuje do oběhového systému. Díky unášení krevním řečištěm je schopen působit na velké vzdálenosti. Cílové buňky jsou ovlivňovány navázáním PRL na prolaktinový receptor (PRL-R) nacházející se na plazmatické membráně (Bole-Feysot et al., 1998).

Sekreci PRL z adenohypofýzy stimuluje tyroliberin (TRH) a inhibuje prolaktostatin (PIH), který je identický s dopaminem. U žen i mužů PRL zvyšuje produkci PIH v hypotalamu a tím dochází k regulaci PRL negativní zpětnou vazbou. Sekrece PIH je inhibována progesteronem a estradiolem, což má za následek zvýšení hladin PRL ve 2. části menstruačního cyklu a v těhotenství. Hlavní funkcí hypofyzárního PRL je

ovlivnění růstu mléčné žlázy a následné laktace (Silbernagl and Despopoulos, 2004).

1.4.2 Mimohypofyzární prolaktin

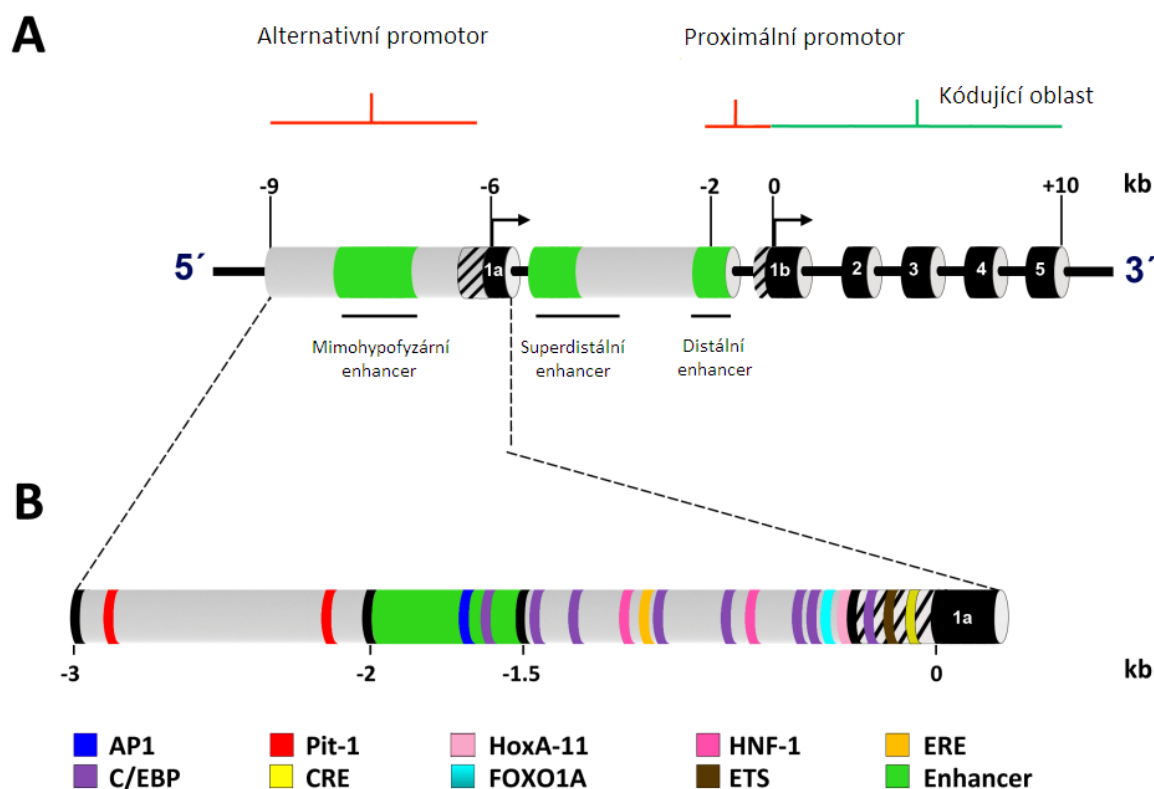
Kromě adenohypofýzy byla genová exprese PRL potvrzena v různých oblastech mozku, decidua, myometria, v slzných žlázách, brzlíku, slezině, v prsních epitelálních buňkách, nádorech, kožních fibroblastech, potních žlázách, ale především byla zaznamenána produkce PRL buňkami imunitního systému – monocyty, lymfocyty a dendritickými buňkami (Ben-Jonathan et al., 1996).

Zdá se, že PRL hraje zásadní roli v imunitním systému, jak bylo zjištěno na kryším modelu, kdy byla u experimentálních zvířat chirurgicky odstraněna hypofýza. Jedinci, kterým byly podávány anti-PRL protilátky, nebyli schopni dlouhodobě přežít. Naopak pokud byla zvířata ponechána bez léčby, jejich stav se po určitém čase stabilizoval a postupně došlo i k obnovení hladiny PRL až na 50% (Nagy and Berczi, 1991). Imunoaktivační funkci PRL uvádí i Cejkova et al. (2012). U skupiny přeživších septických pacientů byl pozorován trend zvýšení hladin mRNA PRL oproti pacientům, kteří zemřeli. Tito nepřeživší pacienti měli na začátku hospitalizace hladiny mRNA periferního PRL nižší než skupina zdravých kontrol a tato snížená aktivace imunitního systému vedla u těchto pacientů k podlehnutí septické infekci. U přeživších pacientů byly během hospitalizace detekovány zvyšující se relativní hladiny mRNA PRL, které se po odeznění akutní fáze opět snižovaly na úroveň zdravých kontrol.

PRL produkovaný mnoha různými typy buněk působí na rozdíl od hypofyzárního PRL nejčastěji na krátké vzdálenosti a ovlivňuje okolní buňky parakrinně, popř. ovlivňuje buňky, které ho samy produkují, autokrinně. Parakrinní nebo autokrinní mechanismy umožňují aktivovat mnoho činností spojených s PRL, aniž by ovlivňovaly hladiny cirkulujícího hormonu. Na rozdíl od hypofyzárního PRL není ten periferní skladován v buňkách a k regulaci jeho sekrece dochází pravděpodobně na úrovni transkripce *PRL* genu (Bole-Feysot et al., 1998).

Primární struktura maturovaného hypofyzárního a mimohypofyzárního PRL se neliší, ačkoli oba tyto PRL jsou přepisovány z jiných promotorů *PRL* genu. Exon jedna je rozdělen na dvě části 1a a 1b. Mezi nimi je vložen proximální promotor, odkud je přepisován hypofyzární PRL – 5'oblast až exon 1b. Hypofyzární PRL je přepisován z oblasti 5.8 kb upstream od promotoru pro hypofyzární PRL – 5'oblast až nekódující exon 1a (Obr. 4) (Gellersen et al., 1994). Mimohypofyzární promotor se vyskytuje pouze

u člověka a vyšších primátů a tím umožňuje vznik dvou odlišných mRNA pro PRL: hypofyzární a 150 bp delší mimohypofyzární PRL (Bole-Feysot et al., 1998).



Obr. 4 Schématické znázornění lidského genu pro prolaktin; **A** – alternativní a proximální promotor, černě jsou zobrazeny exony (1a, 1b, 2 – 5), exon 1a se nachází 5.8 kb upstream od promotoru hypofyzárního prolaktinu; **B** – rozšířený diagram lidského alternativního promotoru pro prolaktin, barevně jsou naznačena místa, kam se s největší pravděpodobností vážou jednotlivé transkripční faktory

(Upraveno podle Díaz et al., 2013)

1.4.3 Prolaktinový receptor

PRL-R je membránovým receptorem patřícím spolu s receptorem pro růstový hormon, leptin a další do rodiny cytokinových receptorů I. subrodiny. PRL-R je kódován genem *PRLR* lokalizovaným na krátkém raménku 5. chromozomu (5p13-14) a jeho součástí je nejméně 10 exonů (Arden et al., 1990).

Pro lidské imunitní buňky je typická nejen produkce PRL, ale samozřejmě i jeho receptoru. Můžeme rozlišit 4 typy PRL-R (Clevenger et al. 2003). Tyto varianty jsou výsledkem alternativního sestřihu mRNA nebo posttranslační proteolýzy. Vykazují odlišnou afinitu k PRL a schopnost spouštět příslušné signalizační dráhy. Ačkoli se v mnohém liší, každá z variant je schopna navázat PRL ve fyziologických koncentracích (Clevenger and Kline, 2001).

Nejen PRL, ale i jeho receptor může hrát důležitou roli v patogenezi onemocnění. Právě lidský placentální antigen (hPL) působí přes PRL-R na mateřské β -buňky, které jsou stimulovány k proliferaci, čímž dochází ke zvýšení jejich počtu během normálně probíhajícího těhotenství. Osa hPL a PRL-R je nezbytná pro udržování stabilní hladiny glukózy v krvi a pokrytí zvýšených metabolických nároků organismu během tohoto období. To vedlo k domněnce, že genetická variabilita PRL-R může vést ke zvýšenému riziku gestačního diabetu (GD). Pro studium genetické variability byly vybrány kandidátní jednonukleotidové polymorfismy (SNP) a u dvou z nich bylo skutečně prokázáno zvýšené riziko vzniku GD pro jejich nositelky (2,36× vyšší riziko vzniku GD). Tyto SNP se vyskytují v 5' UTR promotorové oblasti *PRLR* genu (Le et al., 2013)

1.4.4 Prolaktin a autoimunita

PRL jako cytokin má na buňky imunitního systému účinky proliferační a diferenciací. Působením PRL dochází ke zvýšení produkce celé řady chemokinů a cytokinů. Těmi jsou např. IL-2, IL-10, IL-12, IFN γ a TNF- α (Matera et al., 2000; Matalka, 2003). Kromě produkce cytokinů PRL ovlivňuje i expresi některých genů jako například interferon regulujícího faktoru 1 (IRF-1), který reguluje diferenciaci a maturaci lymfocytů (Yu-Lee, 2001). Kromě výše zmiňovaných Jacobi et al. (2001) uvádí, že PRL může indukovat i produkci imunoglobulinů.

Souvislost autoimunitních onemocnění a HLA antigenů byla zmíněna již výše. *PRL* gen je lokalizován v blízkosti genů kódujících HLA, což může úzce souviset s detekcí zvýšených hladin PRL u pacientů s autoimunitními dysbalancemi (Vera-Lastra et al., 2002).

Ačkoli jsou u mnoha pacientů s autoimunitními onemocněními včetně diabetiků 1. typu detekovány zvýšené hladiny sérového PRL (De Bellis et al., 2005), u tohoto onemocnění není dopad PRL na patogenezi onemocnění zcela jasný, protože bylo prokázáno, že PRL zvyšuje proliferaci β -buněk pankreatu a produkci inzulinu

(Parsons et al., 1992; Brelje et al., 1994). Otázkou tedy zůstává, zda PRL působí stimulačně na T-lymfocyty, které ničí β -buňky pankreatu, nebo proliferačně na β -buňky a ochraňuje je před apoptózou (Fojtíková et al., 2010). Protektivní účinek PRL na myším modelu prokázali i Holstad and Sandler (1999).

2. Hypotézy a cíle diplomové práce

Jako zdroj biologického materiálu pro expresní studie bývají běžně používány buffy coaty získané z transfúzních zařízení. Vzhledem ke specifickým podmínkám doprovázejících odběr, skladování a testy kontroly takto odebraného materiálu, a vzhledem k době, která uplyne od odběru po jejich laboratorní zpracování pro účely expresní studie, jsme se rozhodli otestovat vhodnost použití vzorků buffy coatů získaných od dárců krve Transfúzního oddělení FNKV jako kontrolního souboru (zdravé kontroly).

- Předpokládáme, že exprese vybraných genů (*TLR2*, *TLR4*, *PRL*) se nebude lišit mezi vzorky odebranými jako buffy coat a vzorky odebranými do klasických EDTA vakuových odběrových zkumavek, které jsou zpracovávány do 2 hodin po odběru.

Dále jsme se zaměřili na studium relativních hladin exprese mRNA *PRL*, *TLR2* a *TLR4* u monocytů diabetických i nediabetických pacientů a zdravých kontrol. Obecně je uváděno, že by *PRL* mohl hrát důležitou roli v patogenezi autoimunitních onemocnění svými imunostimulační účinky, tudíž by jeho hladiny měly u pacientů s dysbalancí imunitního systému korelovat s progresí onemocnění. Předpokládali jsme, že monocyty jakožto součást přirozené imunity, budou vykazovat zvýšenou aktivitu u pacientů diabetických i nediabetických, a proto jsme se rozhodli dále sledovat expresi povrchových proteinů *CD14* typických pro monocyty společně s *TLR2* a *TLR4*. Po zhodnocení poznatků z předchozích studií naší laboratoře a studiu článků zabývajících se touto tematikou jsme postulovali následující pracovní hypotézy:

- Pacienti s autoimunitním diabetem budou oproti kontrolám vykazovat zvýšené hladiny *TLR* jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinu.
- Pacienti s autoimunitním diabetem budou vykazovat zvýšené hladiny *PRL* na úrovni mRNA.
- Pacienti s autoimunitním onemocněním budou mít jiné rozložení *CD14⁺⁺* a *CD14⁺* monocytů oproti kontrolám.
- Aktivita „zralejších“ (*CD14⁺*) monocytů bude u pacientů s autoimunitním onemocněním zvýšena oproti kontrolám, případně se bude lišit jejich počet s předpokladem, že autoimunitně nemocní budou mít těchto monocytů více než kontroly.

Dílčím cílem této diplomové práce byla optimalizace stimulací monocytů pro plánovanou studii funkce mimohypofyzárního prolaktinu *in vitro*.

3. Materiál a metody

Výchozím biologickým materiálem pro náš výzkum byla plná krev od pacientů s diabetem (T1D, T2D, LADA), nediabetických pacientů (nonDM), zdravých kontrol a buffy coat od zdravých dárců krve. Zpracováním plné krve i buffy coat jsme získali RNA exprimovanou monocyty a mononukleární buňky, které jsme zpracovali buď na detekci proteinu, nebo jsme je dále použili na buněčnou kultivaci a stimulaci.

3.1 Pacienti

V rozmezí let 2008-2010 byl vytvořen soubor diabetických pacientů sledovaných a diagnostikovaných ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady (FNKV) v Praze. Krev pacientů prošla v rámci upřesnění diagnózy dalšími standardně používanými laboratorními testy. Pro další diagnostické účely byly detekovány relativní hladiny C-peptidu a protilátek GAD a IA-2. Podle hodnot C-peptidu a věku nástupu diabetu byli pacienti rozděleni do skupin: T1D, T2D a LADA.

Ne od všech pacientů byl získán dostatek krve, a proto bylo zpracováno na detekci povrchových proteinů průtokovou cytometrií méně pacientů než na expresi mRNA. Číslo v závorce značí, kolik pacientů bylo zpracováno na průtokovou cytometrii: 21 (16) T1D ve věkovém rozpětí 19–35 let, 16 (8) T2D v rozpětí 40–87 let a 9 (3) LADA pacientů v rozpětí 46–83 let. Počty pacientů zastoupené v jednotlivých skupinách jsou uvedené v tabulkách 3 a 4.

Tab. 3 Sledovaný soubor pacientů pro studium exprese na úrovni mRNA

	muži	ženy	celkem
T1D	14	7	21
LADA	7	2	9
T2D	9	7	16

Tab. 4 Sledovaný soubor pacientů pro studium exprese povrchových proteinů

	muži	ženy	celkem
T1D	11	5	16
LADA	2	1	3
T2D	7	1	8

3.2 Kontroly

Pro potřeby studie byly použity tři kontrolní soubory.

1. Buffy coat získaný od dobrovolných dárců krve z transfúzních oddělení (TO) je celosvětově velmi častým zdrojem biologického materiálu pro expresní studie a to z důvodu snadného přístupu k relativně velkému počtu takovýchto vzorků, a pro excelentní množství krevních buněk. Buffy coat je však na rozdíl od drtivé většiny vzorků pacientů odebírán do odběrových vaků obsahujících CPD antikoagulační činidlo a prochází po odběru celou řadou testů z důvodu zajištění bezpečnosti takového materiálu pro další účely TO, což je poměrně časově náročný proces (8–24 hod.). Jedná se tedy v porovnání k vzorkům pacientů o nestandardní podmínky. Pro otestování vhodnosti vzorků buffy coatů coby kontrolního materiálu bylo zpracováno 25 takových vzorků od zdravých dárců z Transfúzního oddělení Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Sběr a zpracování proběhlo v roce 2010 (skupina TO).
2. Kontrolní skupinu zdravých jedinců, odběr jejichž vzorků byl proveden zcela totožně s odběrem vzorků pacientů, tvoří 24 subjektů. Sběr byl realizován v letech 201–2013 s ohledem na použití stejného antikoagulačního činidla, do kterého byly odebírané vzorky všech pacientů (kys. ethylendiamintetraoctová, EDTA), a s ohledem na způsob odběru a zachování veškerých podmínek doprovázejících samotný odběr a následné nakládání se vzorkem až do okamžiku jeho doručení do naší laboratoře ke zpracování (skupina K).
3. Pro odlišení obecného efektu dysregulace imunitního systému nezpůsobené v důsledku diabetu vznikl v letech 2006–2010 soubor tvořený tzv. nediabetickými pacienty hospitalizovanými ve FNKV se širokým spektrem diagnóz jiných než T1D, LADA či T2D. Nejčastěji byla pacientům diagnostikována ischemická choroba srdeční, hypotyreóza a různá infekční onemocnění (nonDM skupina pacientů).

Stejně jako u pacientů, ani u kontrol nebyly všechny vzorky zpracovány na detekci povrchových proteinů. Celkem byly zpracovány tyto soubory jedinců: 25 (10) TO v rozmezí 19–57 let, 24 (24) K v rozmezí 20–34 let a 25 (6) nonDM ve věkovém

rozmezí 54–92 let. Shrnutí počtu jedinců pozorovaných skupin je uvedeno v tabulkách 5 a 6.

Tab. 5 Sledovaný soubor kontrol pro studium exprese na úrovni mRNA

	muži	ženy	celkem
nonDM	9	14	25
TO	18	7	25
K	4	20	24

Tab. 6 Sledovaný soubor kontrol pro studium exprese povrchových proteinů

	muži	ženy	celkem
nonDM	3	3	6
TO	7	3	10
K	4	20	24

3.3 Studium genové exprese na úrovni mRNA

Ke studiu genové exprese na úrovni mRNA byly využity monocyty imunomagneticky separované z periferní krve nebo buffy coatů. Krev byla odebírána do zkumavek Vacuette® EDTA K3. Z takto získaných monocytů byla vyizolována celková RNA, která byla následně přepsaná reverzní transkripcí na cDNA. Takto získaná cDNA byla výchozím materiálem pro Real-Time PCR (polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase) sloužící ke kvantitativnímu zhodnocení exprese mRNA. V našem případě sledovanými geny byly *PRL*, *TLR2* a *TLR4*. Jako endogenní kontrola byl použit gen *PGK1* (fosfoglycerát kináza 1). Získaná data byla přepočtena na hodnotu 2^{-dCt} (Bustin, 2002) a statisticky vyhodnocena v programu GraphPad Prism 5.

3.3.1 Imunomagnetická separace monocytů

Separace monocytů z periferní krve byla prováděna pomocí magnetických kuliček Dynabeads® s navázanou protilátkou anti-CD14. Průběh celé separace probíhal na ledu a vyizolované monocyty byly uchovány v lyzačním roztoku (Lysis solution) až do doby

jejich dalšího zpracování. Lyzační roztok je součástí izolačního kitu na získání RNA.

Použité chemikálie:

Dynabeads® CD14; Dynal, Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

PBS pH=7,4 (Phosphate Buffered Saline 10×); Gibco, Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

- pracovní roztok 1× PBS

Lysis solution, součást kitu GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit; Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Postup:

1. V 50 ml zkumavce jsme smíchali v poměru 1:1 krev a vychlazené PBS.
2. Dále jsme přidali kuličky Dynabeads podle množství krve (na 1 ml krve 25 μ l kuliček).
3. Za občasného promíchávání jsme nechali zkumavku 20 minut inkubovat na ledu.
4. Poté jsme odšroubovali víčko, přikryli jím otvor a vložili zkumavku do magnetického stojánku umístěného v nádobě s ledem na 3 minuty.
5. Po třech minutách jsme opatrně sejmuli víčko tak, abychom nepohnuli se zkumavkou ve stojánku a nedošlo k uvolnění magnetických kuliček s navázanými buňkami, a pipetou jsme odsáli směs krve a PBS. Monocyty vázané na imunomagnetické kuličky zůstaly přichyceny na stěnách zkumavky v místě jejího styku s magnety.
6. Zkumavku jsme vyndali ze stojánku a doplnili do 15 – 20 ml PBS, krátce, ale důkladně promíchali, aby došlo k oplachu buněk, a vložili opět na 3 minuty do stojánku.
7. Odsáli jsme tekutinu a kroky 5 a 6 jsme ještě 2× opakovali.
8. Po posledním promytí jsme odsáli všechnu tekutinu a přidali 500 μ l lyzačního roztoku a vzniklou suspenzi jsme přenesli do kryozkumavky. Pokud jsme rovnou nepřistoupili k izolaci RNA, tak jsme vzorky zamrazili pro pozdější zpracování.

3.3.2 Izolace RNA

RNA byla izolována z CD14+ monocytů získaných imunomagnetickou separací a

uchovávaných v lyzačním roztoku. K izolaci byl využit komerční kit založený na principu kolonek se silikagelovou membránou, kde dochází k navázání RNA, která je následně promývána a zbavována kontaminujícími látkami. Po purifikaci byla RNA eluována vodou Milli-Q. Celý postup byl prováděn v laminárním boxu.

Použité chemikálie:

- GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit; Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika
- 2-merkaptoetanol
- Wash solution 1 (promývací roztok 1)
- Wash solution 2 (promývací roztok 2)

70% etanol připravený naředěním 96% etanolu; P-LAB a.s., Praha

Voda Milli-Q ze systému Gradient firmy Millipore

Postup:

1. Pokud jsme CD14⁺ monocyty uchovávali zmrazené, pak jsme je před začátkem izolace nechali při pokojové teplotě rozmrazit. V případě, že ne, pracovali jsme dále bez zbytečných časových prodlev, abychom zabránili modifikaci biologického materiálu.
2. K CD14⁺ monocytům v lyzačním roztoku jsme přidali 5 µl 2-merkaptoetanolu a důkladně jsme směs promíchali na vortexu.
3. Vzniklou suspenzi jsme napipetovali do GenElute filtrační kolonky (modré) a centrifugovali při 14 000 rpm po dobu 2 minut.
4. Kolonku jsme vyjmuli a vyhodili. Do filtrátu jsme přidali 500 µl 70% etanolu a promíchali na vortexu.
5. 500 µl vzniklé suspenze jsme napipetovali do GenElute binding kolonky (červené).
6. Zkumavku s kolonkou jsme centrifugovali při 14 000 rpm po dobu 15 vteřin. Filtrát jsme vylili, kolonku vrátili do sběrné zkumavky a přidali zbývající buněčnou suspenzi.
7. Opět jsme centrifugovali při 14 000 rpm po dobu 15 vteřin a vzniklý filtrát vylili a kolonku vrátili.
8. Do kolonky jsme napipetovali 500 µl promývacího roztoku 1 a centrifugovali při 14 000 rpm po dobu 15 vteřin.

9. Kolonku jsme přenesli do čisté sběrné zkumavky a napipetovali 500 μ l promývacího roztoku 2 a centrifugovali při 14 000 rpm po dobu 15 vteřin.
10. Filtrát jsme vylili, kolonku vrátili do sběrné zkumavky a opět napipetovali 500 μ l promývacího roztoku 2 a centrifugovali při 14 000 rpm po dobu 2 minut.
11. Sběrnou zkumavku jsme vylili a kolonku vrátili zpět. Centrifugovali jsme při 14 000 rpm po dobu 1 minuty, abychom kolonku zcela zbavili promývacího roztoku.
12. Kolonku jsme přenesli do čisté sběrné zkumavky, napipetovali 40 μ l Milli-Q vody a nechali minutu stát při pokojové teplotě.
13. Po inkubaci jsme naposledy centrifugovali při 14 000 rpm po dobu 1 minuty a kolonku vyhodili.
14. Filtrát obsahující vyizolovanou RNA jsme si ponechali. Čistotu a koncentraci RNA jsme změřili na nanofotometru (NanoPhotometerTM Pearl; Implen) a dále uchovávali při -80°C.

3.3.3 Reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce

Získaná RNA byla pomocí RT PCR přepsána na cDNA a ta byla dále použita pro Real-Time PCR. Celý postup byl prováděn v laminárním boxu.

Použité chemikálie:

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

- 10 \times RT Buffer
- 25 \times dNTP Mix (100mM)
- 10 \times RT Random Primers
- MultiScribe Reverse Transcriptase

Voda Milli-Q ze systému Gradient firmy Millipore

Postup:

1. Všechny komponenty kitu jsme nechali roztát na ledu.
2. Podle počtu reakcí jsme připravili základní reakční směs podle Tab. 7 (uvedené množství je na jednu reakci). Reakce, kam se nepřidává reverzní transkriptáza, slouží jako negativní kontrola.

Tab. 7 Složení směsi pro jednu reakci RT PCR

Reagencie	Objem (μl)	
	Směs s reverzní transkriptázou	Směs bez reverzní transkriptázy
10× RT Buffer	2,0	2,0
25× dNTP Mix (100mM)	0,8	0,8
10× RT Random Primers	2,0	2,0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0	-
Voda Milli-Q	4,2	5,2
Celkem	10	10

3. Reakční směs jsme promíchali na vortexu a udržovali na ledu.
4. Do každé mikrozkušavky jsme napipetovali 10 μl reakční směsi.
5. Přidali jsme 20 ng RNA a doplnili reakci do objemu 20 μl vodou.
6. Zkušavky jsme krátce centrifugovali, vložili do termocykleru (C1000™ Thermal Cycler; Biorad) a nastavili program:

- | | |
|----------------------------------|--------------------|
| 1. krok (hybridizace s primery): | 10 minut při 25°C |
| 2. krok (extenze): | 120 minut při 37°C |
| 3. krok (denaturace enzymu): | 5 minut při 85°C |

7. Spustili jsme naprogramovaný proces a po jeho dokončení jsme vzorky cDNA uchovávali při -20°C.

3.3.4 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-Time PCR)

Oproti klasické PCR, kdy můžeme zjistit informace o stavu reakce pouze na začátku a na konci, Real-Time PCR nám umožňuje sledovat její průběh přímo během reakce v reálném čase. Ke kvantifikaci námi sledovaného produktu dochází díky použití fluorescenčních sond, které detekují množství PCR produktu zvýšením fluorescenční aktivity. Fluorescenční aktivita je následně zaznamenána halogenovou lampou zabudovanou ve speciálním cycleru. Pomocí software je signál z lampy převáděn do amplifikačních křivek. Výstupem každé reakce je hodnota Ct, což je PCR cyklus, kdy

fluorescence překročí prahovou hranici. Tuto hodnotu získáváme z každé jedné reakce 96 ti jamkové destičky. Pracujeme v technických tripletech, kdy ve třech jamkách probíhá totožná reakce. Výsledné Ct hodnoty těchto tří reakcí zprůměrujeme a tuto průměrnou Ct hodnotu použijeme k výpočtu dCt určujícího relativní rozdíl exprese námi sledovaného genu a endogenní kontroly (v našem případě PGK1) v rámci jednoho vzorku. Hodnota dCt je dále využita k výpočtu 2^{-dCt} , jenž udává relativní množství templátu normalizované ke genu endogenní kontroly. Takto získané údaje vypovídají o relativní míře exprese jednotlivých genů v jednotlivých vzorcích a jsou dále zpracovávány pomocí statistických programů.

Použité přístroje a software:

ABI Prism 7000 SDS, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

7000 System SDS Software, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Použité chemikálie:

TaqMan® Gene Expression Master Mix; Life Technologies-Applied Biosystems, USA

Assays-on-Demand – Taqman® Gene Expression Assays; Life Technologies-Applied Biosystems, USA

- PGK1: Hs99999906_ml
- PRL: Hs00168730_ml
- TLR2: Hs00152932_ml
- TLR4: Hs00152939_ml

RNase free voda, Qiagen, Německo

Postup:

1. Assays-on-Demand (chráněné před světlem) jsme nechali rozmrazit při pokojové teplotě a cDNA na chladícím stojánku.
2. Pro každý gen jsme připravili reakční směs podle Tab. 8.

Tab. 8 Složení reakční směsi pro jednu reakci

Reagencie	Objem (μl)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	12,5
20× Assay-on-Demand Gene Expression Assay Mix	1,25
RNase free voda	1,25
Celkem	15

3. Do každé jamky 96-ti jamkové destičky jsme napipetovali 15 μl reakční směsi pro daný gen. Příklad rozmístění vzorků v destičce viz Tab. 9. Pracovali jsme v technických tripletech.

Tab. 9 Příklady rozmístění reakčních směsí pro jednotlivé geny a cDNA

	PGK1			PRL			TLR2			TLR4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1	D1
B	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2	D2
C	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3	D3
D	D4	D4	D4	D4	D4	D4	D4	D4	D4	D4	D4	D4
E	D5	D5	D5	D5	D5	D5	D5	D5	D5	D5	D5	D5
F	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6
G	D7	D7	D7	D7	D7	D7	D7	D7	D7	D7	D7	D7
H	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK

(NK je negativní kontrola, vzorek bez reverzní transkriptázy)

4. Rozmrzlou cDNA jsme 10× naředili vodou.
5. Do příslušných jamek jsme napipetovali 10 μl cDNA tak, aby nevznikaly bubliny. Pokud vznikly, odsáli jsme je pipetou.
6. Destičku jsme přelepili fólií a centrifugovali při 1 800g 2 minuty.
7. Destičku jsme vložili do přístroje 7000 SDS ABI Prism a měřili pomocí absolutní

kvantifikace. Průběh reakce byl nastaven na následující parametry:

- | | |
|---|--------------------|
| 1. krok (zničení případné kontaminace PCR produktem): | 2 minuty při 50°C |
| 2. krok (hot start): | 10 minut při 95°C |
| 3. krok (denaturace): | 15 vteřin při 95°C |
| 4. krok (hybridizace, extenze): | 1 minuta při 60°C |

kroky 3 a 4 se opakují 50×

8. Po skončení reakce jsme uložili získaná data a následně je zpracovali a statisticky vyhodnotili v programu GraphPad Prism 5.

3.4 Analýza buněk průtokovou cytometrií

Z periferní krve pacientů a zdravých kontrol byly metodou ficoll gradientové centrifugace vyizolovány mononukleární buňky (PBMCs), které byly následně fluorescenčně značeny monoklonálními protilátkami antiCD14, antiTLR2 a antiTLR4. Protilátky antiCD14 jsou značeny fluorescenčním isothiokyanátem (FITC) a TLRs allofukocyaninem (APC). Fluorescenční značení nám umožňuje detekovat povrchové i vnitrobuněčné proteiny a tím kvantifikovat jejich expresi. Na základě těchto informací můžeme získat informace o jednotlivých buněčných populacích. Takto lze sledovat nejen počty jednotlivých populací buněk, ale i rozlišit v rámci populace jednotlivé typy buněk díky odlišné expresi povrchových markerů a jejich rozdílných poměrů, například v rámci populace monocytů odlišit od sebe monocyty klasické, přechodné a neklasické.

3.4.1 Izolace mononukleárních buněk z plné krve

Izolace PBMCs byla prováděna pomocí Ficoll gradientové centrifugace přes Ficoll-Paque PLUS, hustý bezbarvý polysacharidový roztok, který umožňuje separaci krevních elementů na základě jejich hustoty. Těžší erytrocyty pronikají vrstvou této tekutiny až na dno zkumavky zatímco mononukleární buňky tvoří vrstvu na rozhraní mezi plazmou a Ficollem.

Použité chemikálie:

Ficoll-Paque PLUS; GE Healthcare Bio-sciences AB, Švédsko

PBS pH=7,4 (Phosphate Buffer Saline 10×); Gibco, Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

- pracovní roztok 1× PBS

Postup:

1. Do každé ze čtyř 15 ml zkumavek jsme napipetovali 3 ml Ficoll-Paque PLUS.
2. V 50 ml zkumavce jsme smíchali 8 ml plné krve a 8 ml PBS.
3. Na připravený Ficoll-Paque PLUS jsme opatrně navrstvili do každé zkumavky 4 ml předpřipravené směsi plné krve a PBS, tak aby se obě fáze nesmíchaly a byla mezi nimi ostrá hranice a centrifugovali při 4°C na 1 850 rpm po dobu 30 minut.
4. Během centrifugace došlo na základě gradientu ke vzniku zřetelného rozhraní mezi Ficoll-Paque a plazmou, kde se v místě jejich styku vytvořil opalescentní prstenec tvořený PBMCs. Tento prstenec jsme opatrně odebrali pipetou tak, aby došlo k minimální kontaminaci okolními vrstvami.
5. Sebrané PBMCs jsme dali do 50 ml zkumavky, přidali 20 ml PBS a centrifugovali při pokojové teplotě (RT) na 1 500 rpm po dobu 10 minut.
6. Supernatant jsme odlili, vzniklou peletu promíchali na vortexu, přidali 20 ml PBS a centrifugovali při RT na 1 250 rpm po dobu 10 minut.
7. Opět jsme supernatant odlili, peletu promíchali na vortexu a po třetí promyli buňky 20 ml PBS. Tentokrát jsme centrifugovali při RT na 800 rpm po dobu 10 minut, abychom odstranili trombocyty.
8. Na závěr jsme supernatant odlili, vyniklou peletu buněk promíchali na vortexu a doplnili do celkového objemu 1 ml PBS.
9. 10 µl buněčné suspenze jsme odebrali a spočítali výtěžek ficoll gradientové centrifugace za pomoci Bürkerovy komůrky.

3.4.2 Značení buněk protilátkami a analýza na průtokovém cytometru

Vyizolované PBMCs byly inkubovány s fluorescenčně značenými protilátkami a následně analyzovány na průtokovém cytometru. Každý vzorek PBMCs byl rozdělen do tří zkumavek – buňky neznačené, buňky značené pomocí anti-CD14 (FITC) a anti-TLR2 (APC) a buňky značené pomocí anti-CD14 (FITC) a anti-TLR4 (APC).

Použité chemikálie:

PBS pH=7,4 (Phosphate Buffered Saline); Gibco, Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

- pracovní roztok 1× PBS

PBS „pufr“ – PBS s 0,5% FBS a 2mM EDTA

Protilátky: Mouse Monoclonal to CD14 (FITC); Exbio, Česká republika

Mouse Monoclonal to TLR2 (APC); eBioscience, USA

Mouse Monoclonal to TLR4 (APC); eBioscience, USA

Postup:

1. Do každé zkumavky jsme napipetovali 2×10^6 buněk a doplnili do 500 μ l PBS.
2. Zkumavky jsme centrifugovali 2 minuty při 1 800 rpm za pokojové teploty (RT).
3. Odstranili jsme supernatant, peletu buněk jemně promíchali na vortexu a přidali 500 μ l PBS.
4. Opět jsme zkumavky centrifugovali 2 minuty při 1 800 rpm za pokojové teploty.
5. Odstranili jsme supernatant a peletu buněk jemně promíchali na vortexu.
6. Do první zkumavky s neznačenými buňkami jsme přidali 500 μ l PBS, resuspendovali a až do analýzy uložili do chladničky.
7. Do druhé zkumavky jsme přidali 100 μ l PBS, 7 μ l CD14 (FITC) protilátky a 7 μ l TLR2 (APC) protilátky.
8. Do třetí zkumavky jsme přidali 100 μ l PBS, 7 μ l CD14 (FITC) protilátky a 7 μ l TLR4 (APC) protilátky.
9. Buňky jsme nechali chráněné před světlem inkubovat s protilátkami při 4°C po dobu 30 minut.
10. Následně jsme je promyli v 500 μ l PBS a po 2 minutové centrifugaci při RT a odstranění supernatantu jsme opět resuspendovali v 500 μ l PBS.
11. Krok 10 jsme ještě 2× opakovali.

12. Na průtokovém cytometru (FACSCalibur; Becton-Dickinson) jsme zdetekovali 30 000 buněk a získané údaje jsme uložili pro další zpracování v programu CellQuestPro.

3.5 Statistické zpracování

Získaná data jsme statisticky zpracovali pomocí programu GraphPad Prism 5. Nejdříve jsme provedli D'Agostino Pearson test normality. V případě našich dat nebylo pozorováno normální rozložení, a proto jsme použili neparametrický Mann Whitney test. Pro vícerozměrnou analýzu jsme použili Kruskal-Wallisův test. Hranice statistické významnosti byla $p < 0,05$.

3.6 Optimalizace pro stimulace monocytů – *in vitro* studie funkce mimohypofyzárního prolaktinu

Dalším z cílů této diplomové práce byla stimulace monocytů prolaktinem *in vitro*, která by nám umožnila získat komplexní pohled na monocyty a zároveň odpověděla na otázky funkce periferního prolaktinu u autoimunitních onemocnění.

Před stimulací samotným prolaktinem bylo potřeba optimalizovat postup kultivace a stimulace za pomoci lipopolysacharidu (LPS), hlavní složky vnější membrány Gram negativních bakterií. Níže uvedené postupy vycházejí a navazují na předchozí optimalizační experimenty (Němečková, 2012), kdy jedním z nejdůležitějších kroků optimalizace byla výměna výchozího biologického materiálu (původně byl používán buffy coat z TO FNKV). Pro stimulace v předkládané práci již byla použita plná krev zdravých dárců odebraných do zkumavek Vacuette® Coagulation (3,2% citrát sodný), ze které jsme ficoll gradientovou centrifugací vyizolovali PBMCs (viz kapitola 3.4.1). Dalším zásadním krokem, který této práci předcházel, bylo otestování různých typů LPS a jako vhodný byl pro následné optimalizační postupy zde prezentované vybrán lipopolysacharid z *E. coli* typ 0127:B8.

3.6.1 Kultivace a stimulace monocytů

Použité chemikálie:

Kompletní médium: RPMI 1640, 10% FBS, 1% Penicilin/Streptomycin (sterilizace přes filtr 0,22 µm; MILLIPORE)

- RPMI 1640 w. L-glutamine and NaHCO₂; Sigma-Aldrich, Česká republika
- FBS (Fetal bovine serum, PAA Clone, Low Endotoxin); PAA The Cell Culture Company, Rakousko
- Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Stabilized; Sigma-Aldrich, Česká republika

Lipopolysacharid from *E. coli* 0127:B8; Sigma-Aldrich, Česká republika

PBS pH=7,4 (Phosphate Buffered Saline 10×); Gibco, Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA

- pracovní roztok 1× PBS

Lysis solution, součást kitu GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit; Sigma-Aldrich, Česká republika

Použitý plast – endotoxin-free:

24-jamkové destičky – Nunclon Surface; Nunc, Dánsko

Špičky (1 µl) – ExPellPLUS; Capp, Dánsko

Zkumavky (15 ml) – 430052; Corning, Mexiko

Kryozkumavky (2 ml) – MTC-200-C; Axygen Scientific, Inc., USA

Optimalizace množství stimulačního agens

Postup:

1. Vyizolované, promyté a spočítané PBMCs jsme rozdělili do pěti jamek 24-jamkové destičky tak, aby v každé jamce bylo $2,5 \times 10^6$ buněk, a doplnili do 1 ml kompletním médiem. Jamky jsme označili podle času stimulace a množství přidaného LPS: 22K, 2R, 2L10, 2L100 a 2L500 (Tab. 10). Celkem jsme použili dvě destičky, abychom zabránili možné kontaminaci blanku (nestimulované kontroly) lipopolysacharidem.

Tab. 10 Optimalizace množství přidaného LPS

Vzorek	doba „uklidnění“ (hod.)	doba stimulace (hod.)	množství LPS (ng)
22K	22	×	×
2R	22	×	×
2L10	22	2	10
2L100	22	2	100
2L500	22	2	500

- Destičky jsme vložili na 5 hodin do termostatu.
- Po pěti hodinách jsme vyměnili kompletní médium za čerstvé a vložili na dalších 17 hodin zpět do termostatu. Po odsátí média jsme odstranili suspenzní buňky a na dně jamky pak zůstaly adherované monocyty
- 15 minut před uplynutím celkové doby 22 hodin jsme vortexem míchali LPS, protože při skladování v chladu vytváří agregáty, které je třeba homogenizovat.
- Po 22 hodinách jsme z jamek odsáli médium. Buňky v jamce 22K jsme opláchli 1 ml PBS, vyfotili a přidali 500 µl lyzačního roztoku. Do ostatních jamek jsme přidali příslušné množství LPS rozpuštěné v 1 ml média. Do jamky 2R jsme přidali pouze 1 ml média bez LPS, protože sloužila jako blank. Destičky jsme vložili na 2 hodiny inkubovat do termostatu.
- Po 2 hodinách inkubace jsme odsáli médium, buňky opláchli 1 ml PBS, vyfotili a sklidili pomocí 500 µl lyzačního roztoku.
- Z takto získaných vzorků buněčných lyzátů jsme vyizolovali RNA, tu přepsali reverzní transkripcí do cDNA a následně vyhodnotili na Real-Time PCR.

Optimalizace délky doby „uklidnění“ monocytů

Z důvodů rychlé diferenční aktivity monocytů v makrofágy a jejich omezené životnosti jsme se původní čas „uklidnění“ 22 hodin pokusili zkrátit, abychom mohli sledovat dlouhodobý vliv exogenního prolaktinu na monocyty (16 a více hodin).

Doba stimulace LPS 2 hodiny byla zachována. Na základě předchozích experimentů jsme použili 500 ng LPS a krok 3 (výměna média) byl v dalších postupech

vynechán, protože při zkrácení doby „uklidnění“ již nehrozilo vyčerpání živin z média buňkami.

Provedli jsme tedy stimulace, kterým předcházelo „uklidnění“ 3 a 8 hodin při zachování času stimulace 2 hodiny. Na obě časové skupiny byly použity PBMCs od jednoho dárce (zpracováno a nasazeno v jeden čas). V tabulce 11 jsou uvedeny testované časy uklidnění a stimulace.

Tab. 11 Optimalizace doby „uklidnění“ a stimulace buněk

Vzorek	doba „uklidnění“ (hod.)	doba stimulace (hod.)	množství LPS (ng)
2R3	3	2	500
2L3	3	2	500
2R8	8	2	500
2L8	8	2	500

4. Výsledky

4.1 Studium genové exprese na úrovni mRNA

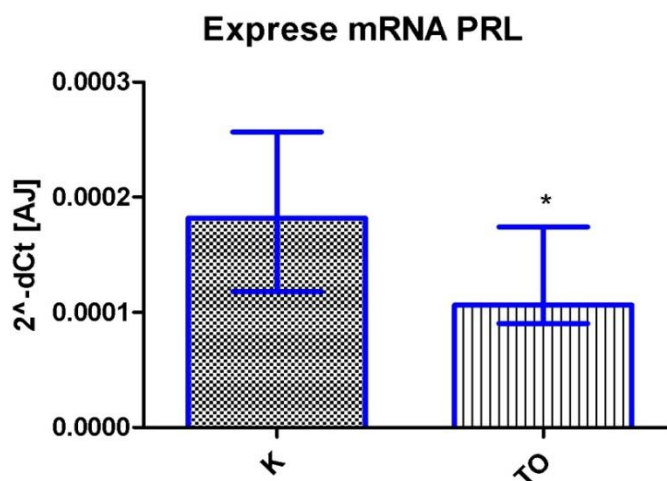
Získané hodnoty Ct z Real-Time PCR byly přepočteny na 2^{-dCt} a následně statisticky vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5 (více viz kapitola 3.5).

4.1.1 Exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 v monocytech periferní krve odebrané do Vacuette® K3 EDTA a v monocytech z buffy coatů

Za účelem otestování, zda jsou pro sledované skupiny diabetických pacientů vhodným kontrolním souborem zdravých jedinců vzorky buffy coatů dárců krve odebrané do odběrovaných vaků s CPD antikoagulačním roztokem (citrát fosfát dextróza), byly stanoveny a porovnány relativní hladiny mRNA PRL, TLR2 a TLR4 genů v monocytech zdravých jedinců odebraných do K3 EDTA vakuových zkumavek (skupina K) a v monocytech získaných separací z buffy coatů dárců krve z Transfúzního oddělení FNKV (skupina TO).

Prolaktin

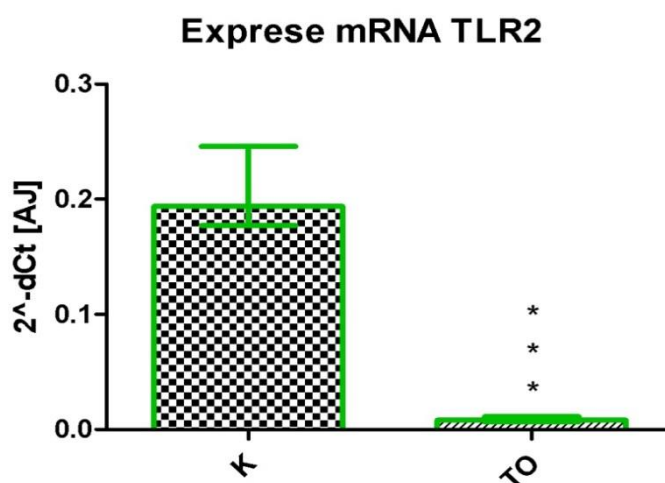
Porovnáním exprese mRNA PRL v monocytech skupin odebraných do K3 EDTA (K) a buffy coatů dárců krve (TO) za použití Mann Whitney testu byl pozorován statisticky významný rozdíl mezi oběma sledovanými skupinami ($P < 0,05$). U zdravých kontrol byla relativní exprese mRNA PRL zvýšena $1,71\times$ (viz Graf 1).



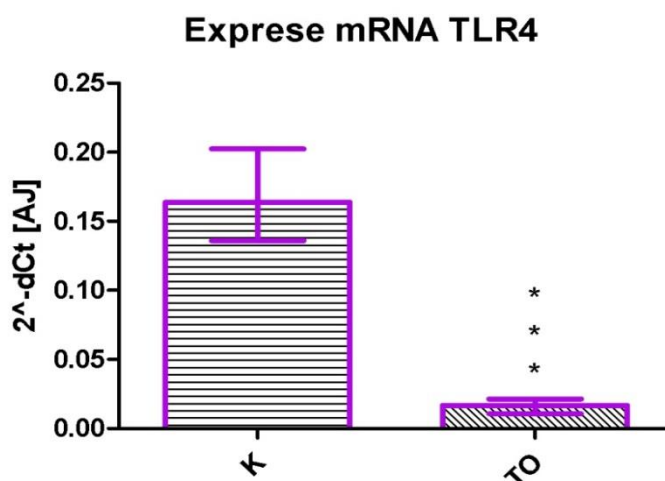
Graf 1 Exprese mRNA PRL v monocytech zdravých kontrol odebraných do EDTA (K) a buffy coatech zdravých dárců krve (TO)

Toll-like receptor 2 a Toll-like receptor 4

Pro porovnání exprese mRNA TLR2 a TLR4 v monocytech skupin zdravých kontrol a buffy coat dárců krve jsme opět použili Mann Whitney test. I zde byl pozorován statisticky významný rozdíl mezi oběma sledovanými skupinami jak pro mRNA TLR2, tak i pro TLR4. U obou sledovaných genů byla P hodnota menší než 0,0001. U zdravých kontrol byla relativní exprese mRNA TLR2 zvýšena $23,8 \times$ (viz Graf 2) a u mRNA TLR4 byla exprese u zdravých kontrol zvýšena $9,78 \times$ (viz Graf 3).



Graf 2 Expresse mRNA TLR2 v monocytech zdravých kontrol odebraných do EDTA (K) a buffy coatech zdravých dárců krve (TO)



Graf 3 Expresse mRNA TLR4 v monocytech zdravých kontrol odebraných do EDTA (K) a buffy coatech zdravých dárců krve (TO)

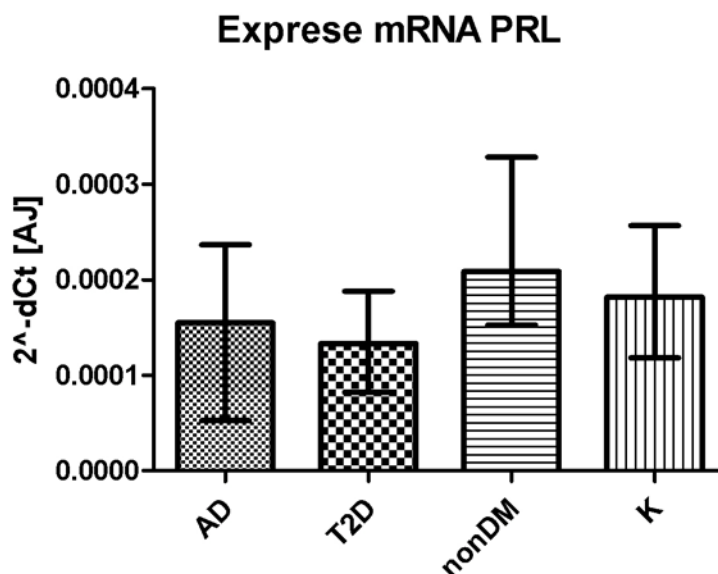
Po vyhodnocení změn relativních hladin exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 jsme se rozhodli dále pracovat pouze se zdravými kontrolami, protože u všech výše uvedených genů byly pozorovány signifikantní rozdíly mezi expresí mRNA u monocytů zdravých kontrol a buffy coat dárců krve.

4.1.2 Změny exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 u monocytů diabetických pacientů a kontrol

Pro zhodnocení relativních hladin exprese mRNA v monocytech pacientů a kontrol jsme použili Kruskal-Wallisův test. V první řadě bylo nutno ověřit, zda existuje rozdíl v expresi sledovaných genů mezi dvěma skupinami s autoimunitním diabetem a to skupinou T1D a skupinou LADA. V případě homogenity dat od pacientů s autoimunitní poruchou lze totiž skupinu T1D a LADA sloučit. Protože nebyl prokázán ani u jednoho ze sledovaných genů signifikantní rozdíl v expresi, tyto dvě skupiny jsme sloučili a dále pracovali se skupinou jedinou, klasifikovanou jako pacienti s autoimunitním diabetem (AD). Veškerá další testování tak byla provedena u dvou skupin pacientů s diabetem mellitus (AD, T2D) a dvou skupin kontrolních (nonDM, K).

Prolaktin

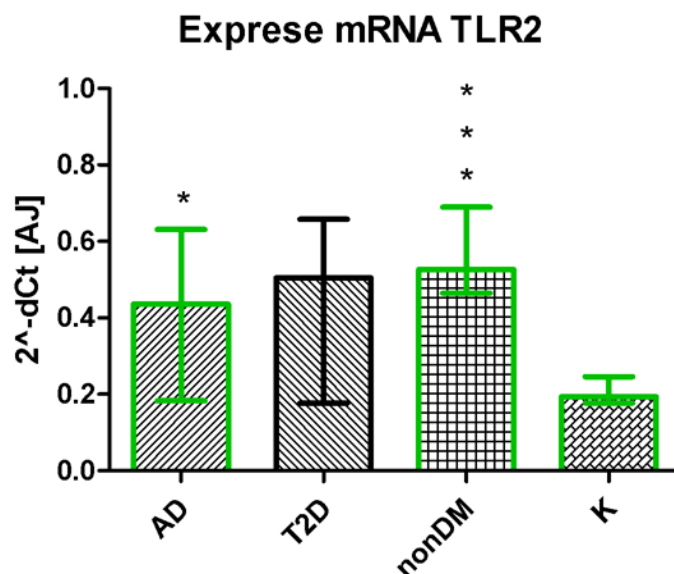
Vzájemné porovnání relativních hladin exprese mRNA PRL v monocytech jednotlivých skupin pacientů a kontrol naznačilo statisticky významný rozdíl mezi skupinami ($P = 0,04$). Jednotlivé skupiny jsme proto porovnali mezi sebou neparametrickým Mann Whitney testem a zjistili, že exprese mRNA PRL je u nonDM pacientů 1,57× zvýšená oproti T2D skupině pacientů ($P < 0,05$) (viz Graf 4).



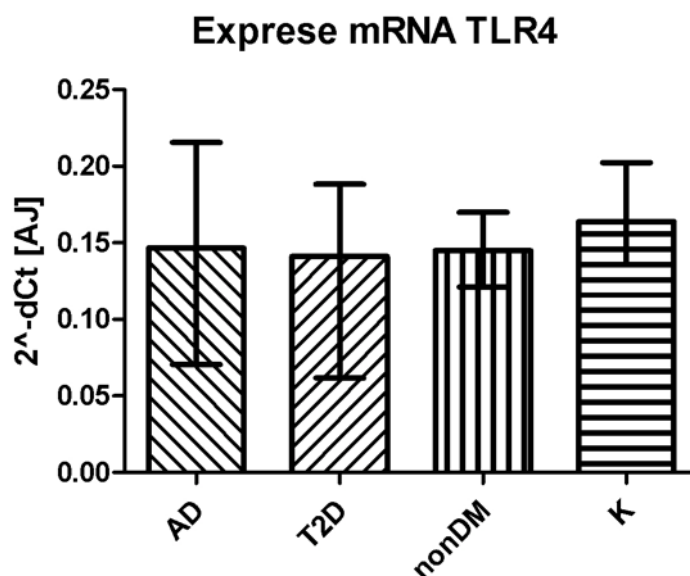
Graf 4 Expresse mRNA PRL v monocyttech pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí

Toll-like receptor 2 a Toll-like receptor 4

Předpokládali jsme, že exprese mRNA TLRs v monocyttech pacientů s AD bude zvýšená jak u mRNA TLR2 tak i u TLR4. U exprese mRNA TLR2 se nám podařilo tento trend potvrdit ($P < 0.0001$), kdy exprese mRNA TLR2 byla zvýšená u AD pacientů oproti kontrolám $2,25\times$ a u nonDM pacientů oproti kontrolám $2,72\times$ (viz. Graf 5), zatímco u exprese mRNA TLR4 jsme žádný signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami nepozorovali ($P = \text{NS}$) (viz Graf 6).



Graf 5 Expres mRNA TLR2 v monocytech pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. K, nonDM vs. K)

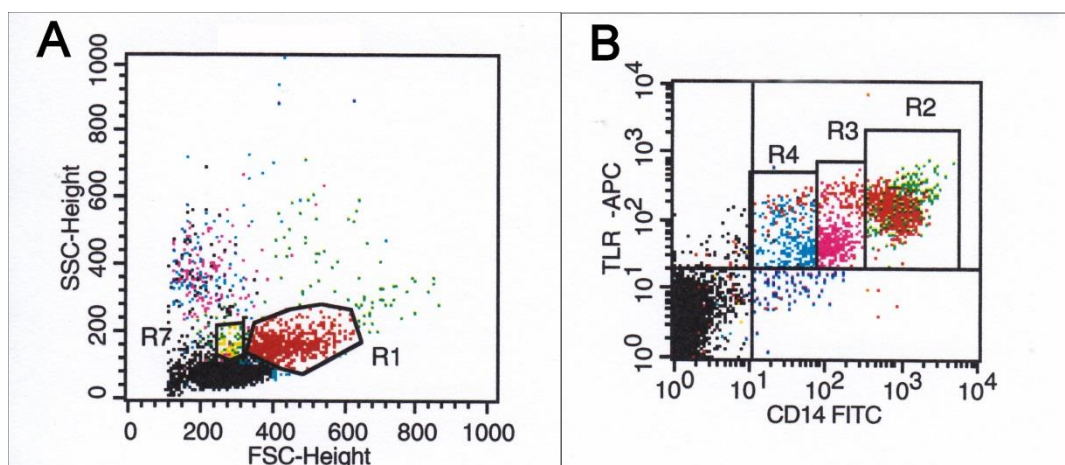


Graf 6 Expres mRNA TLR4 v monocytech pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x mezikvartilové rozpětí

4.2 Analýza buněk průtokovou cytometrií

Pro analýzu jednotlivých populací buněk a pro určení jejich relativního zastoupení v rámci organismu byl průtokový cytometr (FACSCalibur; Becton-Dickinson) nastaven na detekční limit 30 000 událostí.

Na základě fyzických znaků jakými jsou velikost a granularita byla vymezena populace monocytů (Obr. 5A). Pomocí detekce dvojité pozitivního fluorescenčního značení CD14 (FITC) a TLR2 (APC) nebo TLR4 (APC) byly buněčné profily rozděleny na buňky s vysokou (označené jako CD14++) a s nízkou (označené jako CD14+) hladinou exprese těchto povrchových markerů a vymezeny tak dva typy monocytů (Obr. 5B). U těchto subpopulací byly sledovány absolutní počty takto značených buněk, a prostřednictvím parametru MFI (průměrná míra fluorescence) i průměrná míra exprese každého ze tří sledovaných znaků v jednotlivých subpopulaci.



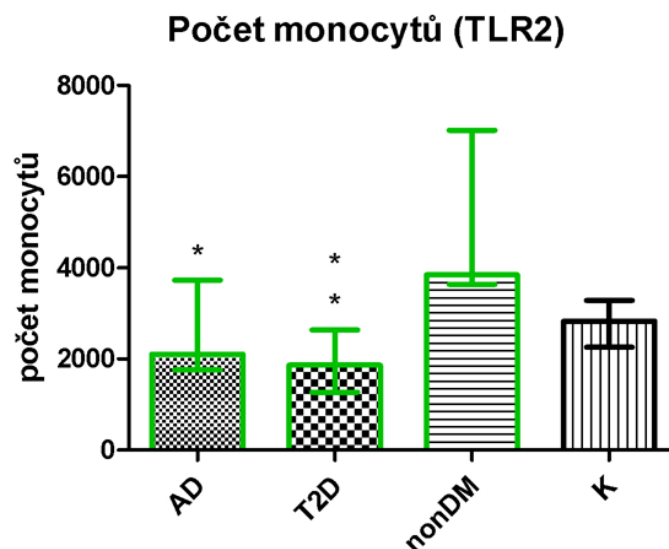
Obr. 5 Grafický výstup z průtokového cytometru; na obr. **5A** je znázorněno rozdělení buněk na základě fyzických parametrů, na ose x je velikost buněk a na ose y jejich granularita (vnitřní komplexita), gate R1 ohraničuje populaci monocytů; na obr. **5B** je na ose x zobrazena míra fluorescence CD14 antigenu a na ose y míra fluorescence TLR antigenu, gate R2 ohraničuje oblast CD14++ TLR++ buněk, gate R3 CD14+ TLR++ buňky a R4 CD14+ a TLR+ buňky

Před komplexní analýzou všech sledovaných skupin jsme porovnali skupiny T1D a LADA pacientů neparametrickým Mann Whitney testem. Jelikož jsme neprokázali signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami, sloučili jsme tyto dvě skupiny a dále pracovali se skupinou pacientů s autoimunitním diabetem (AD). Tím jsme získali dvě skupiny pacientů (AD, T2D) a dvě skupiny kontrol (nonDM, K), které jsme mezi sebou porovnávali Kruskal-Wallisovým testem.

4.2.1 Porovnání počtu monocytů mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrol

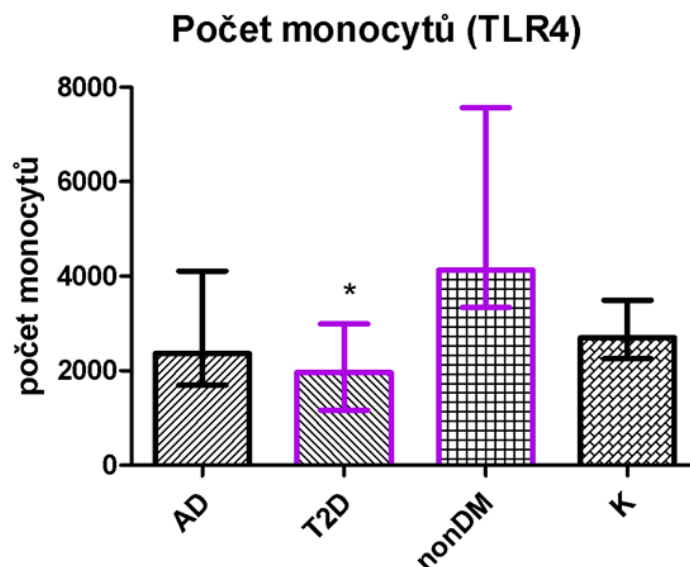
Pro pochopení role monocytů u autoimunitních onemocnění jsme v první řadě u jednotlivých skupin pacientů a kontrolního souboru detekovali počty monocytů charakterizovaných na základě jejich fyzických vlastností – velikosti a vnitřní komplexity. Uvedeny jsou výsledky jak pro vzorek značený antiCD14/antiTLR2 (Graf 7), tak vzorek antiCD14/antiTLR4 protilátkami (Graf 8).

Žádná ze sledovaných skupin pacientů s diabetem (AD, T2D) se v počtu monocytů nelišila od zdravé populace. Signifikantní rozdíly v počtu monocytů u vzorků značených antiCD14/antiTLR2 protilátkami jsme pozorovali mezi skupinami nonDM a AD, kdy u nonDM skupiny bylo detekováno $1,83\times$ více monocytů než u AD pacientů ($P < 0,05$) a mezi nonDM a T2D pacienty, kdy nonDM pacienti měli oproti T2D skupině $2,05\times$ více monocytů ($P < 0,01$) (viz Graf 7).



Graf 7 Počet monocytů u pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. nonDM, T2D vs. nonDM)

Podobně jako v případě sledování antiCD14/antiTLR2 markerů, také u vzorků značených pomocí antiCD14/antiTLR4 protilátek se ukázalo, že ani jedna skupina diabetických pacientů se co do počtu monocytů periferní krve neliší od zdravých subjektů; ve srovnání s nediabetickou kontrolou však byl zjištěn statisticky významně nižší počet monocytů u T2D pacientů ($2,1\times$ méně, $P < 0,05$) a obdobný trend byl zachycen u skupiny autoimunitního diabetu ($1,75\times$ nižší, $P = \text{NS}$) (viz Graf 8).



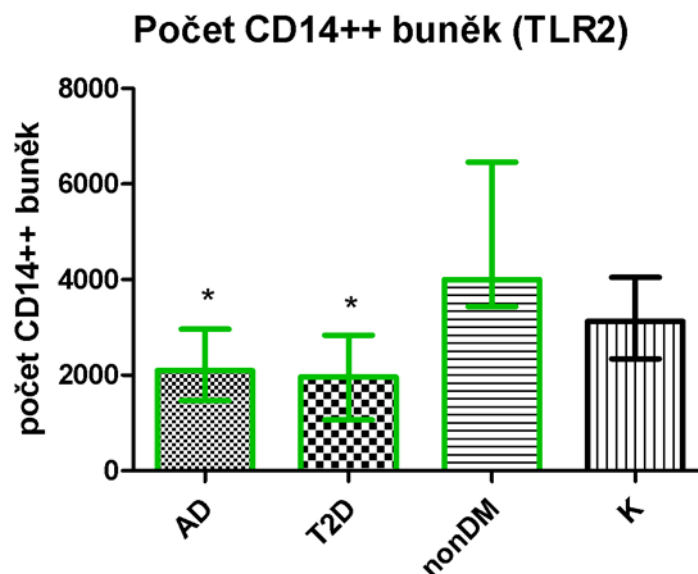
Graf 8 Počet monocytů u pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (T2D vs. nonDM)

4.2.2 Porovnání počtu CD14++ buněk a jejich míry fluorescence CD14 antigenu mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrol

Použitím dvojité pozitivního značení jsme byli schopni detekovat expresi povrchových proteinů a kvantifikovat míru jejich fluorescence. Stejně jako v kapitole 4.2.1 jsou výsledky vždy uvedeny jak pro vzorek značený antiCD14/antiTLR2, tak vzorek antiCD14/antiTLR4 protilátkami.

antiCD14/antiTLR2

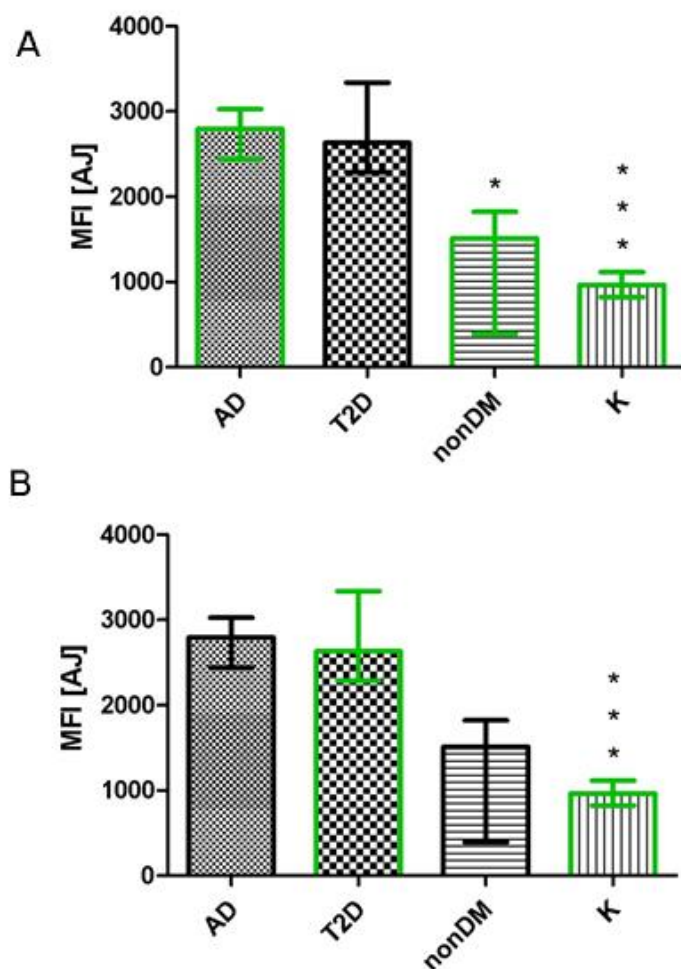
Mezi zdravými kontrolami a AD skupinou nebyl pozorován rozdíl v počtu CD14++ buněk ($P = \text{NS}$), zatímco mezi skupinou nonDM a AD pacientů a mezi nonDM skupinou a T2D pacienty již ano. Pacienti s AD měli $1,91\times$ méně CD14++ buněk než nonDM pacienti ($P < 0,05$) a T2D pacienti $2,03\times$ méně než nediabetičtí pacienti ($P < 0,05$) (viz Graf 9).



Graf 9 Počet CD14++ buněk u pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. nonDM, T2D vs. nonDM)

Na rozdíl od analýzy počtu CD14++ buněk, kdy sice byly nalezeny statisticky významné rozdíly, ale v žádném z těchto výsledků nefigurovaly zdravé kontroly zároveň se skupinou AD pacientů, detekce míry fluorescence CD14 antigenů nám přinesla zajímavější výsledky. Oproti zdravým kontrolám měli AD pacienti 2,9× vyšší míru fluorescence CD14 antigenů a T2D pacienti 2,72× ($P < 0,0001$). AD pacienti měli zvýšenou míru fluorescence i ve srovnání s nonDM pacienty a to 1,85× ($P < 0,05$) (viz Graf 10).

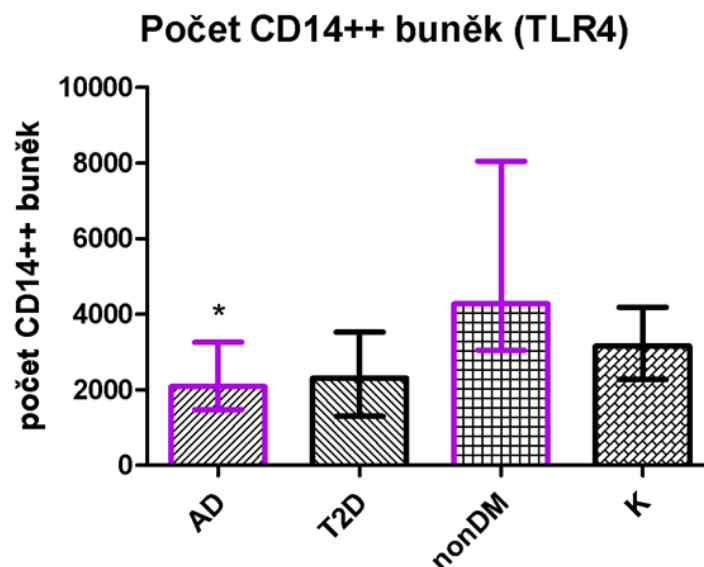
Míra fluorescence CD14 antigenu u CD14++ buněk (TLR2)



Graf 10 Míra fluorescence CD14 antigenu CD14++ buněk pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); **graf A** ukazuje vztahy AD vs. nonDM a AD vs. K, **graf B** T2D vs. K, výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou

antiCD14/antiTLR4

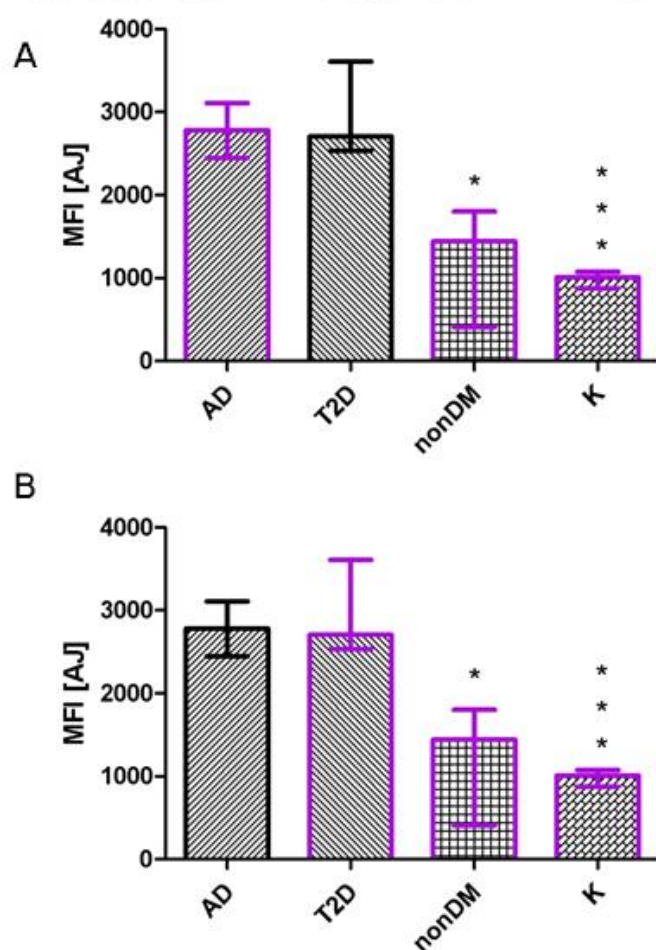
Ani u buněk značených antiCD14/antiTLR4 protilátkami nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v počtu CD14++ buněk mezi zdravými kontrolami a diabetiky. Rozdíl byl pozorován mezi skupinou nonDM pacientů a AD pacientů. NonDM pacienti měli 2,05× více CD14++ buněk než skupina AD ($P < 0,05$) (viz Graf 11).



Graf 11 Počet CD14++ buněk u pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. nonDM)

Při detekci míry fluorescence CD14 antigenu značeným antiCD14/antiTLR4 protilátkami byla u AD pacientů změřena $1,93\times$ vyšší míra fluorescence CD14 antigenu než u nonDM skupiny ($P < 0,05$) a dokonce $2,76\times$ zvýšenou míru fluorescence oproti zdravým kontrolám ($P < 0,0001$). Míra fluorescence CD14++ buněk byla u T2D pacientů $1,87\times$ vyšší oproti nonDM pacientům ($P < 0,05$) a $2,69\times$ vyšší oproti zdravým kontrolám ($P < 0,0001$) (viz Graf 12).

Míra fluorescence CD14 antigenu u CD14++ buněk (TLR4)



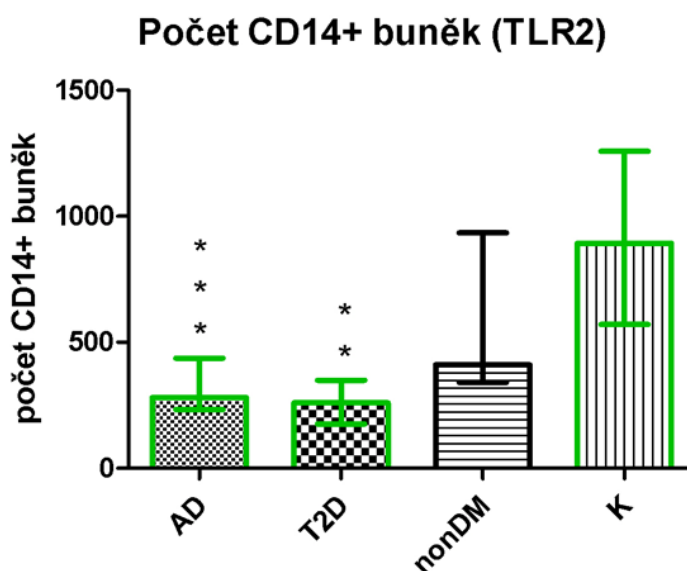
Graf 12 Míra fluorescence CD14 antigenu CD14++ buněk pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); **graf A** ukazuje vztahy AD vs. nonDM a AD vs. K, **graf B** T2D vs. nonDM a T2D vs. K, výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou

4.2.3 Porovnání počtu CD14+ buněk a jejich míry fluorescence CD14 antigenu mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrol

Zjištění počtu a míry fluorescence CD14+ buněk bylo pro naši studii klíčové vzhledem k jejich předpokládané autoimunitní funkci.

antiCD14/antiTLR2

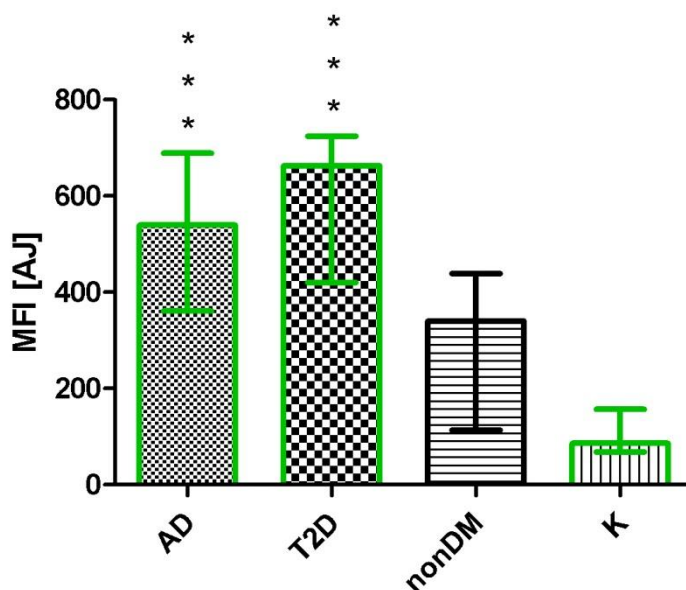
Signifikantní rozdíl v počtu CD14+ buněk byl pozorován mezi skupinami diabetických pacientů a zdravých kontrol. Pacienti s AD měli 3,18× méně CD14+ buněk než zdravé kontroly ($P < 0,0001$) a T2D pacienti 3,45× méně než K ($P < 0,01$) (viz Graf 13).



Graf 13 Počet CD14+ buněk u pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. K, T2D vs. K)

Zatímco u porovnání počtu buněk měli diabetičtí pacienti méně CD14+ buněk oproti zdravým kontrolám, míra fluorescence CD14 antigenu u těchto skupin vykazuje trend opačný, a to vyšší míru exprese povrchových CD14 molekul u diabetických pacientů oproti zdravým kontrolám. U AD pacientů byla zaznamenána 6,27× vyšší míra fluorescence oproti zdravým kontrolám ($P < 0,0001$) a u T2D pacientů dokonce 7,71× vyšší než u K ($P < 0,0001$) (viz Graf 14).

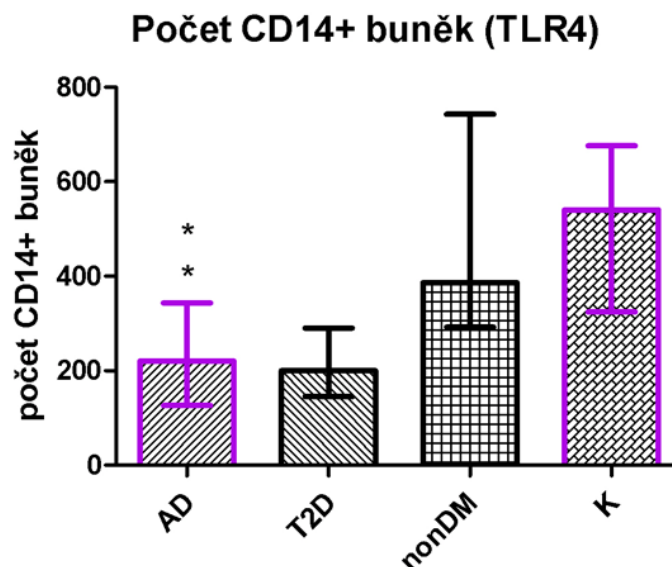
Míra fluorescence CD14 antigenu u CD14+ buněk (TLR2)



Graf 14 Míra fluorescence CD14 antigenu CD14+ buněk pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. K, T2D vs. K)

antiCD14/antiTLR4

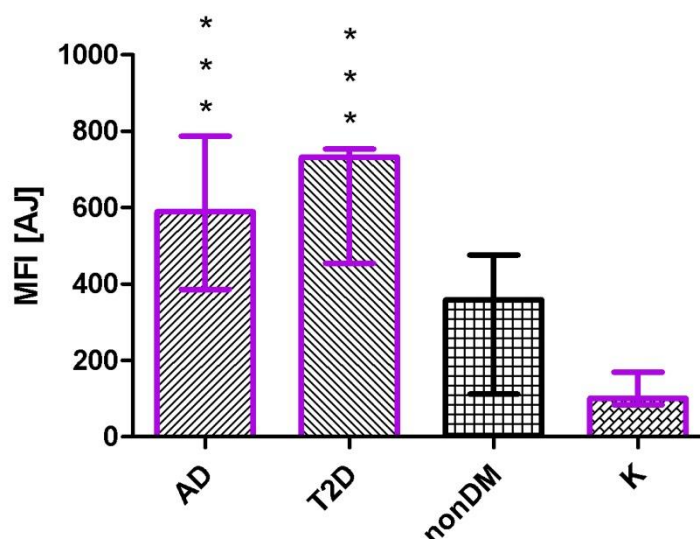
Porovnání počtu CD14+ buněk značených antiCD14/antiTLR4 protilátkami jsme detekovali 2,45× více těchto buněk u zdravých kontrol než u skupiny AD pacientů ($P < 0,01$). U T2D pacientů byl tento trend snížení počtu CD14+ buněk oproti zdravým kontrolám také pozorován (2,7× nižší, $P = \text{NS}$) (viz Graf 15).



Graf 15 Počet CD14+ buněk u pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. K)

Porovnání míry fluorescence CD14+ buněk značených antiCD14/antiTLR4 přineslo podobné výsledky jako u buněk značených antiCD14/antiTLR2 I zde byla pozorována vyšší míra fluorescence AD skupiny oproti zdravým kontrolám a to $5,84\times$ ($P < 0,0001$) a u skupiny T2D oproti kontrolám $7,25\times$ ($P < 0,0001$) navzdory jejich hodnotám absolutního počtu CD14+ buněk vykazující trend opačný (viz Graf 16).

Míra fluorescence CD14 antigenu u CD14+ buněk (TLR4)



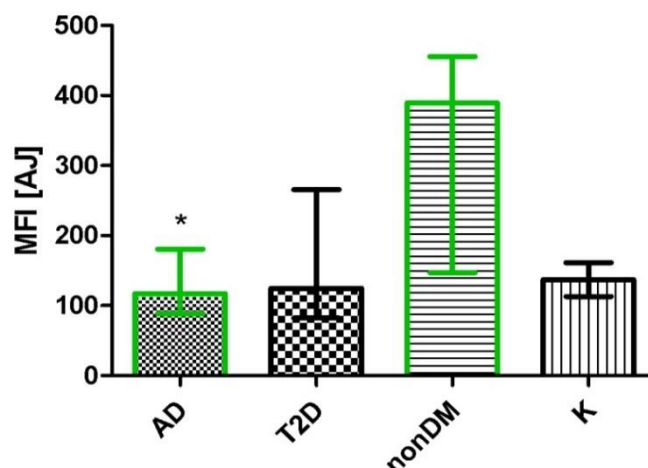
Graf 16 Míra fluorescence CD14+ buněk pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. K, T2D vs. K)

4.2.4 Porovnání míry fluorescence antigenu u TLR2 a TLR4 pozitivních buněk mezi jednotlivými skupinami pacientů a kontrol

Při porovnání míry fluorescence TLR2 antigenu u TLR2+ buněk jsme nezjistili žádný statisticky významný rozdíl mezi diabetiky a zdravými kontrolami. Signifikantní rozdíl jsme našli pouze mezi skupinou AD a nonDM pacientů, kdy nediabetičtí pacienti měli 3,31× zvýšenou míru fluorescence TLR2 antigenu ($P < 0,05$) (viz Graf 17).

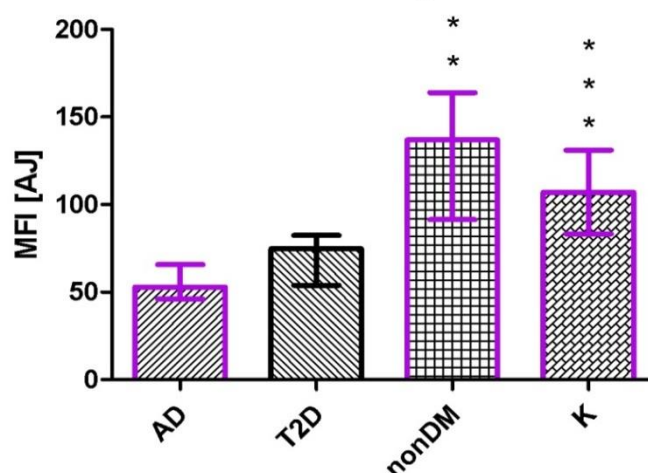
U TLR4+ buněk jsme zaznamenali signifikantní rozdíl nejen mezi AD skupinou a nonDM, ale i mezi autoimunitními diabetiky a zdravými kontrolami. Pacienti s autoimunitním diabetem měli 2,02× vyšší míru fluorescence oproti kontrolám ($P < 0,0001$) a nediabetičtí pacienti 2,59× vyšší ($P < 0,01$) (viz Graf 18).

Míra fluorescence TLR2 antigenu u TLR2+ buněk



Graf 17 Míra fluorescence TLR2 antigenu u TLR2+ buněk pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. nonDM)

Míra fluorescence TLR4 antigenu u TLR4+ buněk



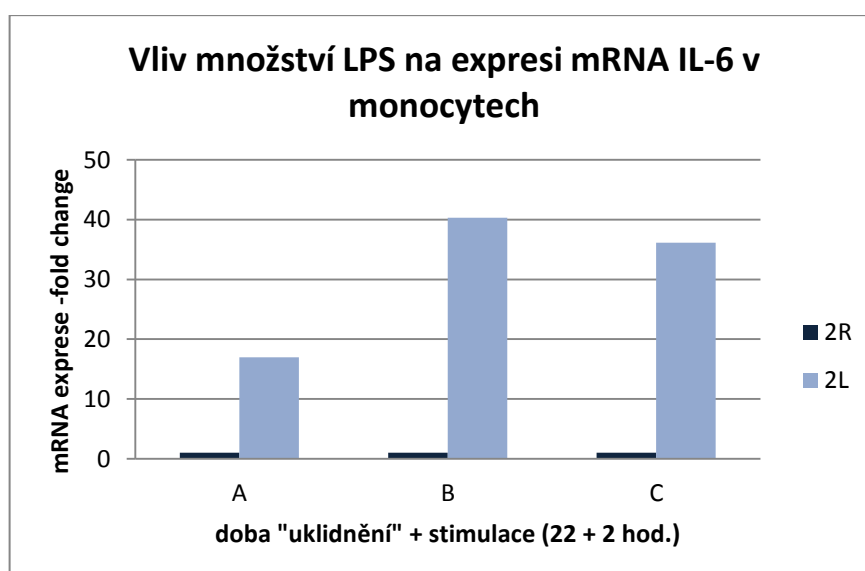
Graf 18 Míra fluorescence TLR4 antigenu u TLR4+ buněk pacientů s autoimunitním diabetem (AD), diabetem 2. typu (T2D), nediabetických pacientů (nonDM) a zdravých kontrol (K); výška sloupce udává hodnotu mediánu a čáry vodorovné s osou x značí mezikvartilové rozpětí, hvězdičky míru signifikance, barevně jsou vyznačeny signifikantní vztahy, kdy k sobě vztahujeme vždy sloupec bez hvězdičky a s hvězdičkou (AD vs. nonDM, AD vs. K)

4.3 Optimalizace *in vitro* kultivací – vliv délky doby „uklidňování“ monocytů na jejich stimulaci

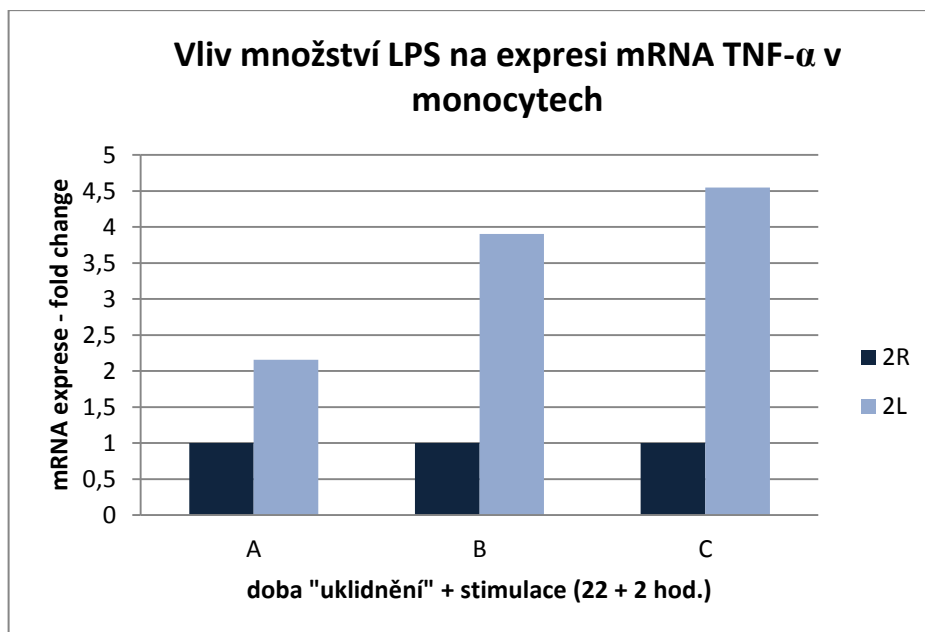
Opět jsme sledovali relativní hladiny mRNA a to IL-6 a TNF- α . Ke stimulaci došlo v tomto případě pouze u monocytů „uklidňovaných“ 8 hodin. Po 8 hodinách „uklidnění“ a 2 hodinách stimulace byly relativní hladiny mRNA IL-6 u stimulovaných monocytů zvýšeny 6,6 \times a mRNA TNF- α 4,1 \times (viz Graf 21 a 22).

4.3.1 Optimalizace *in vitro* kultivací – vliv množství LPS na stimulaci monocytů

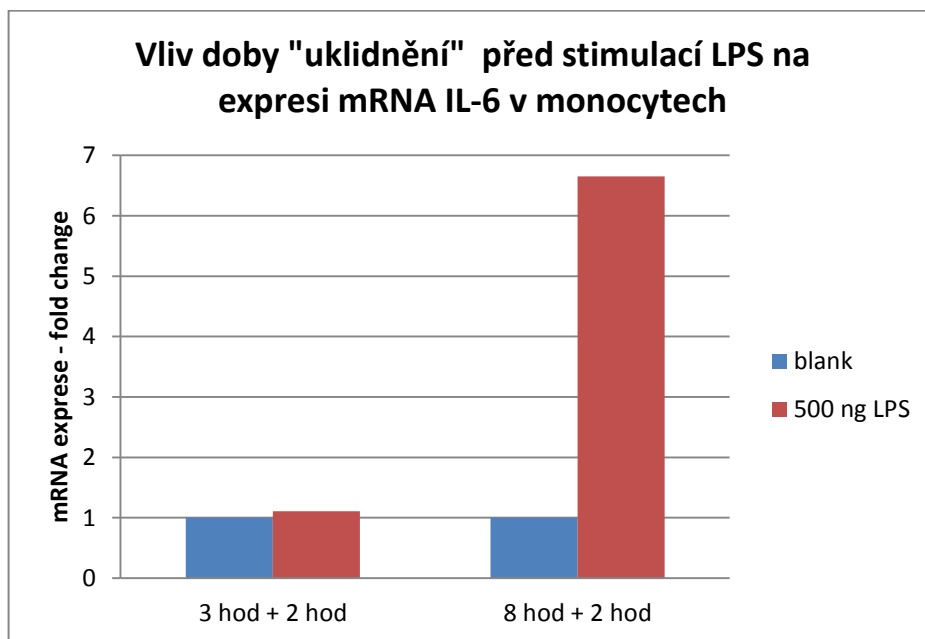
Pro posouzení vlivu stimulačního agens na monocyty byly po stimulaci měřeny relativní hladiny exprese mRNA prozánětlivých cytokinů (IL-6 a TNF- α). Zjistili jsme, že ke stimulaci monocytů dochází při dávce 10 ng, 100 ng i 500 ng LPS. Nejlepších výsledků jsme pak dosáhli při stimulaci 500 ng a tyto hodnoty stimulace jsme přepočítali na fold change (kolikrát došlo ke zvýšení exprese mRNA prozánětlivých cytokinů u stimulovaných monocytů vůči blanku) a jsou uvedeny v grafu 19 a 20. Tento stimulační pokus jsme provedli třikrát. Pokaždé byla dárce jiná osoba označená A, B a C. U vzorku A došlo ke zvýšení mRNA IL-6 vůči blanku 17 \times a mRNA TNF- α 2,1 \times a u vzorku B byla zvýšena mRNA IL-6 u stimulovaných monocytů 40,3 \times a mRNA TNF- α 3,9 \times . Vzorek C měl při stimulaci expresi mRNA IL-6 zvýšenou 36,2 \times a mRNA TNF- α 4,5 \times .



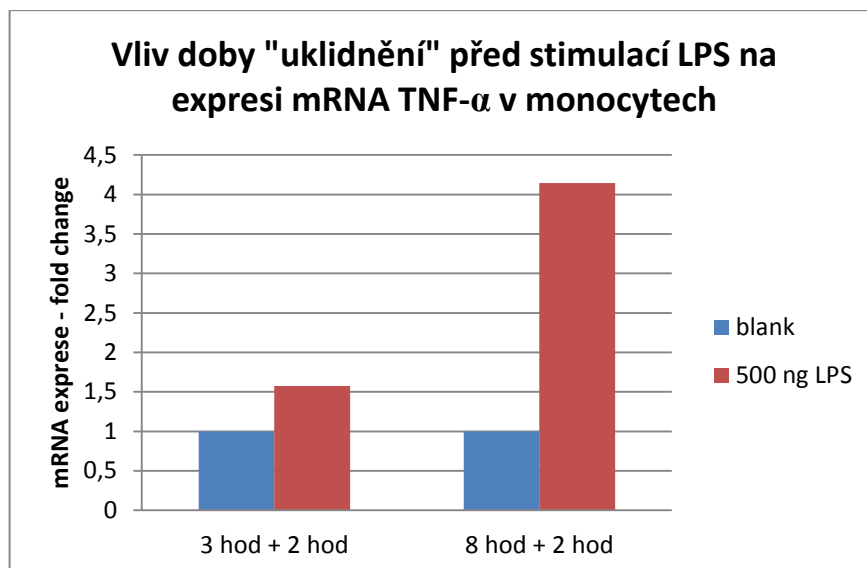
Graf 19 Vliv množství LPS (500 ng) na expresi mRNA IL-6 v monocytech „uklidňovaných“ 22 hodin; A, B, C – označení vzorku (dárce); 2R (blank), 2L (stimulované monocyty)



Graf 20 Vliv množství LPS (500 ng) na expresi mRNA TNF- α v monocytech „uklidňovaných“ 22 hodin; A, B, C – označení vzorku (dárce); 2R (blank), 2L (stimulované monocyty)

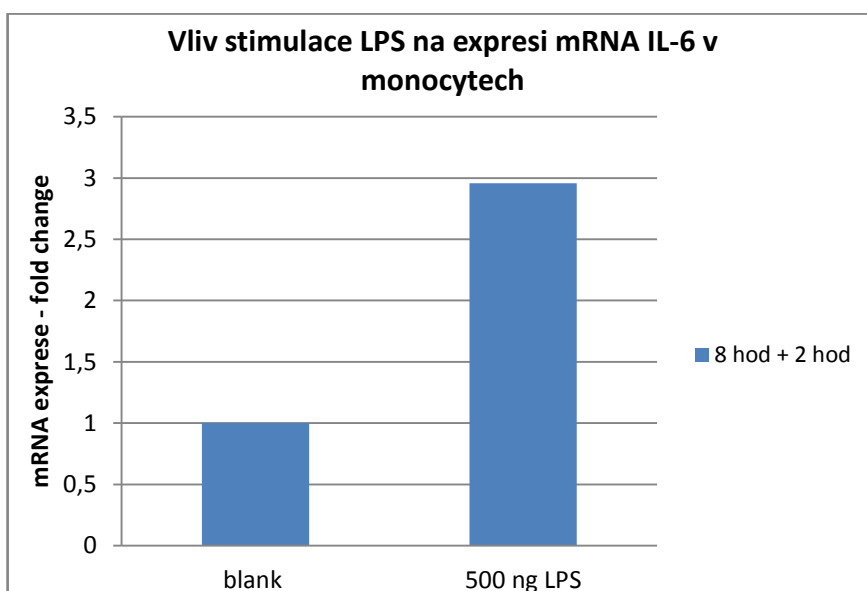


Graf 21 Vliv doby „uklidnění“ před stimulací LPS (500 ng) na expresi mRNA IL-6 v monocytech „uklidňovaných“ 3 nebo 8 hodin. 3 hod + 2 hod: „uklidnění 3 hodiny, stimulace 2 hodiny; 8 hod + 2 hod: „uklidnění 8 hodin, stimulace 2 hodiny

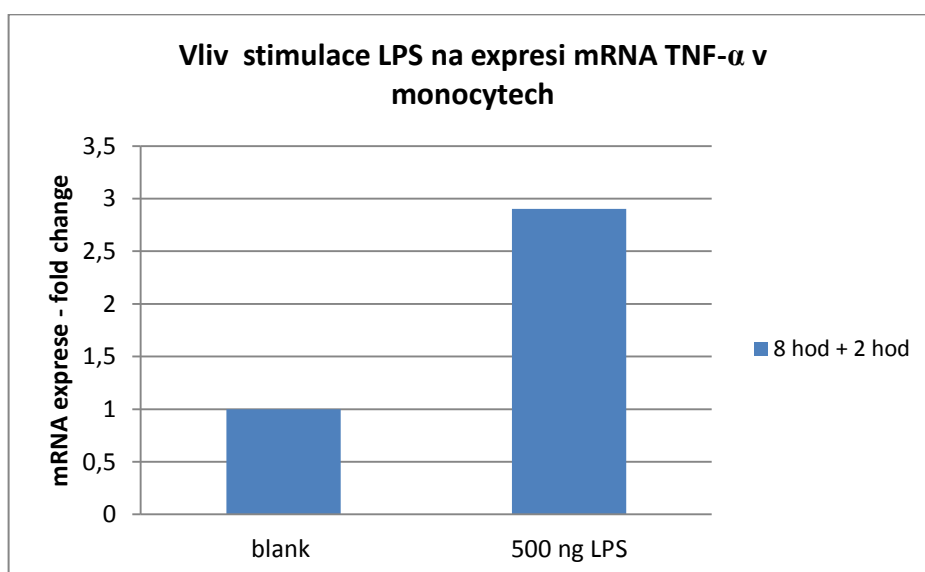


Graf 22 Vliv doby „uklidnění“ před stimulací LPS (500 ng) na expresi mRNA TNF- α v monocytech „uklidňovaných“ 3 nebo 8 hodin. 3 hod + 2 hod: „uklidnění 3 hodiny, stimulace 2 hodiny; 8 hod + 2 hod: „uklidnění 8 hodin, stimulace 2 hodiny

Pro ověření předchozího nálezu byla kultivace s dobou „uklidnění“ 8 hodin zopakována s monocytami jiného dárce. I u tohoto vzorku došlo k prokazatelné stimulaci LPS. Relativní hladiny mRNA IL-6 i TNF- α byly zvýšeny 3 \times (viz Graf 23 a 24).



Graf 23 Vliv stimulace LPS (500 ng) na expresi mRNA IL-6 v monocytech „uklidňovaných“ 8 hodin, doba stimulace 2 hodiny



Graf 24 Vliv stimulace LPS (500 ng) na expresi mRNA TNF- α v monocytech „uklidňovaných“ 8 hodin, doba stimulace 2 hodiny

5. Diskuze

Předkládaná diplomová práce se zabývá rolí monocytů, klíčových buněk nespecifické větve imunitního systému, v diabetu. Během jejího vypracování jsem se soustředila na dva základní úkoly: i) Otestovat vhodnost použití buffy coatů dárců krve jako kontrolního souboru reprezentujícího zdravou populaci porovnáním tohoto materiálu s kontrolní skupinou zdravých dárců odebranou standardním způsobem (systém Vacuette® K3 EDTA), a ii) blíže poznat a charakterizovat monocyty nemocných diabetem prostřednictvím sledování exprese jejich genů pro *PRL*, *TLR2* a *TLR4*. Pomocí průtokové cytometrie jsme získali absolutní počty monocytů a CD14++ a CD14+ buněk. Vedle početního zastoupení studovaných buněk jsme hodnotili i míru fluorescence jejich povrchových antigenů CD14, TLR2 a TLR4. Míra exprese mRNA byla kvantifikována pomocí PCR v reálném čase (Real-Time PCR). Dílčím cílem této práce byla optimalizace metody *in vitro* kultivace a stimulace monocytů.

i) Použití buffy coatu v expresních studiích

Porovnáním zdravých kontrol odebraných do stejného antikoagulačního činidla jako byli odbíráni pacienti (EDTA) a buffy coatů z TO FNKV jsme odhalili signifikantní rozdíly v expresi mRNA všech sledovaných genů. Kontrolní vzorky v EDTA měly vůči vzorkům TO (buffy coaty) zvýšenou expresi mRNA *PRL* 1,71×, mRNA *TLR2* 23,8× a mRNA *TLR4* 9,78×.

Tento jev lze vysvětlit nejlépe dvěma hlavními faktory: časem, který uplynul od odběru do zpracování vzorku pro studium genové exprese, a odlišným antikoagulačním činidlem v odběrové nádobě. Je zřejmé, že určitým způsobem dochází k modifikaci biologického materiálu vlivem obou těchto faktorů.

Zpracování krve pro potřeby transfúzních oddělení je proces složitý a zdoluhavý z důvodů nejen technologických, kdy dochází k separaci vybraných krevních elementů, případně plazmy, ale i bezpečnostních, kdy musí být dárcovská krev vyšetřena na infekční onemocnění, která by v případě, že by nebyla detekována, mohla mít pro příjemce fatální následky. Doba, která uplyne mezi odběrem a naším laboratorním zpracováním, se pohybuje mezi 8 – 24 hodinami. Po celou tuto dobu krevní buňky již nejsou v jejich přirozeném *in vivo* prostředí a lze tedy očekávat změny v jejich chování (například nestandardní buněčné interakce, odlišná aktivace/deaktivace genů). Odebráním plazmy, jak

tomu je u buffy coatu, se navíc buňky dostávají do stresu proto, že dochází k zahuštění původního prostředí a tím ke vzniku nefyziologických podmínek. Je logické, že buňky v této situaci začnou reagovat spuštěním jiných signálních drah a tím i změnou exprese, která může být u určitých markerů upregulovaná, zatímco u jiných může docházet k downregulaci. Lze předpokládat, že k upregulaci bude docházet u prozánětlivých cytokinů, což naznačuje i práce „Vrozená imunita a cirkulující monocyty - význam a funkce v patogenezi celiakie“ (Němečková, 2012), kde autorka detekovala jinak jen obtížně vysvětlitelné velmi signifikantní zvýšení relativních hladin mRNA některých prozánětlivých cytokinů u zdravých kontrol (buffy coatů) v porovnání s pacienty s celiakií odebraných systémem Vacuette® K3 EDTA. Z pozorování v předkládané práci vyplývá, že u námi sledovaných markerů (PRL, TLR2, TLR4) naopak dochází k downregulaci.

Dalším faktorem, který by mohl zásadně ovlivnit krevní vzorek, je antikoagulační činidlo. Engstad et al. (1997) porovnávali expresi TNF- α indukovanou LPS v závislosti na použitém typu antikoagulačního činidla. Těmi byly EDTA, citrát, heparin a hirudin. Autoři studie potvrdili domněnku, že hladiny produkce TNF- α a s ním spojená i odlišná vnímavost buněk vůči LPS závisí na typu antikoagulačního činidla. To by znamenalo, že antikoagulační činidlo může buňky modifikovat prostřednictvím vazby na jejich receptory a měnit tak jejich vnitřní prostředí. Komplexní studie, která by se zabývala vlivem stresu souvisejícím s odběrem (samotný akt odběru, odběrová nádoba) a zpracováním krve pro potřeby transfúzních jednotek (zejména mnohahodinové testy z důvodu kvality a bezpečnosti), však doposud chybí. Faktor stresu při odběru periferní krve a jeho dopad na imunitní systém dárce zkoumali Dostál a kolektiv, kteří sledováním změn hladiny sérového prolaktinu ve třicetiminutových intervalech po zavedení kanyly změřili postupný nárůst prolaktinu v séru a tak zároveň potvrdili jeho roli coby stresového cytokinu (Dostál et al., 2003). Wadhwa et al. (2000) zase upozorňuje na možné riziko pro příjemce skladovaných koncentrovaných erytrocytů díky zvýšeným hladinám prozánětlivých cytokinů. Bohužel konkrétní dopad nefyziologických podmínek daných odběrem a vleklým zpracováním materiálu transfúzními stanicemi na imunitní buňky, zejména pak monocyty, však zatím není znám.

ii) Expresní analýza monocytů pacientů s autoimunitním diabetem a diabetem 2. typu

Stanovení expresních profilů sledovaných genů u jednotlivých skupin onemocnění za účelem blíže porozumět změnám souvisejícím s onemocněním přineslo některé

překvapivé výsledky.

Sledováním aktivace genu pro prolaktin jsme chtěli ověřit možnost, že jeho patologická sekrece ovlivní rovnováhu imunitního systému a příslušnou reakci imunitních buněk s následkem rozvoje diabetu. De Bellis et al. (2005) uvádí, že zvýšené hladiny sérového PRL jsou detekovány u skupin pacientů s autoimunitními onemocněními v akutní fázi. Patří sem onemocnění systémová i orgánově specifická. Ačkoli výše uvedená studie hodnotila hladiny sérového PRL a v naší práci byla měřena exprese mRNA PRL v monocitech, mnoho autorů potvrzuje funkci PRL jako cytokinu s prozánětlivými účinky a lze tedy předpokládat jeho zvýšenou expresi v akutní fázi onemocnění (Matera et al., 2000; Vera-Lastra et al., 2002). Nicméně, naše studie zvýšené hladiny mimohypofyzárního PRL u AD pacientů oproti zdravým kontrolám nezaznamenala, což může být vysvětleno tím, že tito diabetičtí pacienti zahrnutí do naší studie jsou léčeni již mnoho let a tudíž nejsou v akutní fázi onemocnění, kdy dochází k zánětlivým reakcím a destrukci β -buněk T-lymfocyty.

T2D pacienti také nevykazovali v porovnání se zdravými kontrolami zvýšené hladiny mRNA PRL. Lehce snížené hladiny mRNA PRL byly zaznamenány při porovnání T2D pacientů a nonDM pacientů, kdy T2D skupina vykazovala $1,57\times$ nižší expresi. Zvýšené hladiny PRL u nonDM pacientů lze s přihlédnutím k jejich diagnóze očekávat. Ve své studii Reuwer et al. (2011) potvrzují, že zvýšené hladiny PRL mohou pozitivně korelovat s rizikem aterosklerotických změn.

Situace u sledovaných Toll-like receptorů byla poněkud odlišná. Při porovnání exprese mRNA TLR2 jsme detekovali $2,25\times$ zvýšené hladiny mRNA TLR2 u skupiny AD pacientů oproti zdravým kontrolám, kdežto exprese mRNA *TLR4* genu byla beze změny u všech pozorovaných skupin. Tyto poznatky pouze částečně korelují s výsledky Devaraj et al. (2008), kteří detekovali zvýšenou expresi TLR2 i TLR4 antigenu u T1D pacientů.

Odlišné výsledky jsme zaznamenali při analýze povrchových proteinů. Hodnocena byla míra fluorescence (MFI) protilátky navázané na sledovaný antigen, která tak přesně koreluje s expresí sledovaného povrchového proteinu. U TLR2 pozitivních buněk nebyl pozorován rozdíl v MFI TLR2 antigenu diabetických pacientů a zdravých kontrol. Statisticky významný rozdíl jsme našli pouze mezi AD pacienty a nonDM pacienty, kdy AD skupina měla $3,31\times$ sníženou produkci TLR2 antigenu a zároveň i nejnižší expresi ze všech sledovaných skupin. I u TLR4 pozitivních buněk byla nejnižší

míra fluorescence detekována u AD pacientů s tím, že mezi touto skupinou a skupinou kontrol byl zaznamenán silný signifikantní rozdíl ($2\times$ nižší exprese než u zdravých jedinců).

Zvýšená exprese mRNA i proteinu u nonDM skupiny byla očekávaná a lze ji přisoudit heterogenitě onemocnění jedinců zařazených do této skupiny. Nejčastějšími onemocněními této skupiny byla infekční onemocnění a ischemické choroby (srdeční, dolních končetin), které úzce souvisí se zánětlivými stavy. Naopak snížená exprese povrchového antigenu TLR2 a TLR4 u AD pacientů byla neočekávaným zjištěním a lze ji vysvětlit dostatečnou suplementací léky, kdy nedochází k hyperglykémii, která aktivuje expresi TLR2 a TLR4 (Mohammad et al., 2006).

Na základě fyzických parametrů jsme porovnali celkové počty monocytů u všech čtyř skupin. Zde jsme nepředpokládali, že by se počty monocytů jednotlivých skupin významně lišily. Porovnání počtu monocytů jednotlivých skupin však odhalilo trend k nižším počtům těchto buněk u diabetických pacientů oproti kontrolám, ačkoli nebyla potvrzena statistická významnost tohoto jevu. Zvýšené počty monocytů jsme zaznamenali pouze u nonDM pacientů, kteří měli více monocytů než AD i T2D pacienti. To lze opět přisoudit charakteru onemocnění, s kterými byli tito pacienti hospitalizováni.

Buňky značené monoklonálními protilátkami jsme díky dvojité pozitivnímu značení mohli rozdělit na buňky CD14⁺⁺ TLR⁺ a CD14⁺ TLR⁺. Inkubovali jsme buňky jak s anti-TLR2 tak i s anti-TLR4 protilátkou. CD14⁺⁺ buňky bychom mohli zařadit do kategorie klasických monocytů. Lze usuzovat, že by se počet těchto buněk neměl mezi skupinami významně lišit. Naopak CD14⁺ buňky bychom mohli považovat za neklasické monocyty a zde bychom očekávali zvýšené počty buněk u pacientů s autoimunitním onemocněním (Cros et al., 2010; Ziegler-Heitbrock, 2010).

Stejně jako u celkového počtu monocytů, i u buněk CD14⁺⁺ (značených TLR2 i TLR4) byl pozorován trend snížení počtu těchto buněk u skupin AD a T2D oproti zdravým kontrolám, a signifikantní rozdíl byl nalezen mezi skupinou nonDM (zvýšené počty buněk) a AD a T2D skupinou (snížené počty buněk). Tento výsledek lze očekávat, obzvláště u pacientů, kteří se léčí s infekčním onemocněním či s jiným akutním stavem. Překvapivá však byla míra exprese antigenu CD14 na CD14⁺⁺ buňkách, neboť u T1D pacientů byla míra fluorescence CD14 antigenu zvýšena oproti zdravým kontrolám $2,9\times$ a u T2D $2,72\times$.

T1D pacienti měli zvýšenou tvorbu CD14 antigenu i oproti nonDM skupině. To znamená, že T1D i T2D pacienti exprimují mnohem více povrchového antigenu CD14 než zdraví jedinci a nonDM pacienti. Zvýšená MFI, která koreluje s expresí sledovaného povrchového proteinu CD14 ukazuje, že ačkoli absolutní počet buněk u AD pacientů je nižší než u zdravých kontrol, může být aktivita CD14++ buňky (klasického monocyty) modifikována díky expresi povrchových markerů. CD14 molekula je důležitým koreceptorem TLR4, který je spolu s ostatními TLRs nedílnou součástí vrozené imunity. Výsledkem spuštění této signalizační dráhy je produkce prozánětlivých cytokinů hrajících důležitou roli v patogenezi autoimunitního onemocnění (Akashi-Takamura and Miyake, 2006).

CD14+ buňky v souladu s literaturou (Cros et al., 2010; Ziegler-Heitbrock, 2010) považujeme za „zralejší“ a proto jsme předpokládali, že skupina AD pacientů bude vykazovat jejich zvýšené počty. Nečekaným zjištěním tedy bylo, že jsme u AD pacientů detekovali signifikantně nižší počty těchto buněk v porovnání ke skupině K (6,27× u TLR2 značených buněk; 2,45× u TLR4 značených buněk). Snížený výskyt oproti zdravým kontrolám byl prokázán i u skupiny T2D pacientů. Naproti tomu, a obdobně jako při sledování míry povrchové exprese CD14 receptoru u klasických monocytů, MFI antigenu CD14 i u „zralejších“ CD14+ monocytů měla profil zcela opačný, kdy AD a T2D pacienti vykazovali zvýšenou expresi povrchových CD14 antigenů oproti zdravé kontrole. U AD pacientů byla MFI CD14 antigenu zvýšena 6,27× v TLR2 a 5,84× v TLR4 značeném vzorku. T2D vykazovali vůči zdravé kontrole zvýšenou produkci povrchového CD14 antigenu 7,71× v TLR2 a 7,25× v TLR4 vzorku. Shodně s našimi výstupy detekoval Patiño et al. (2000) u diabetických pacientů oproti zdravým kontrolám signifikantně více povrchových CD14 antigenů na neklasických monocytech (v práci charakterizovány nejen slabou expresí CD14, ale zároveň pozitivitou na CD16 antigen (CD14+ CD16+). Pacienti byli rozděleni na jedince s přidruženými kardiovaskulárními chorobami a na nemocné bez nich. Pacienti s přidruženým kardiovaskulárním onemocněním vykazovali nejvyšší MFI. Tento autor navrhuje, že zvýšená exprese CD14 povrchových proteinů může ovlivňovat endotoxiny zprostředkované zánětlivé mechanismy, které mohou být zapojeny do aterogeneze a tím přispívat ke vzniku aterosklerotických onemocnění. Data o přidružených kardiovaskulárních komplikacích našich diabetických pacientů však nemáme k dispozici a nemůžeme proto postulovanou hypotézu ověřit. V nonDM skupině, kde byli zařazeni i pacienti s kardiovaskulárními onemocněními, jsme však tento trend

nepozorovali. Je otázkou, zda by zpřesnění klasifikace monocytů v naší studii pomocí stanovení exprese CD16 antigenu ovlivnila výstupy našich dat. V potaz je také nutno brát velikost souboru a skutečnost, že pouze 26 % pacientů nonDM skupiny trpělo kardiovaskulárními chorobami.

Otázkou zůstává, jak vysvětlit, že při gatování na základě fyzických znaků buněk byl u všech sledovaných skupin naměřen přibližně stejný počet monocytů, zatímco při dvojité pozitivním fluorescenčním značení jsme vždy získali menší počet buněk u obou diabetických skupin. V případě značení TLR4 byl dokonce tento rozdíl mezi T2D pacienty a zdravými kontrolami statisticky významný. Domníváme se, že gatováním na základě fyzických vlastností buněk byly s největší pravděpodobností do analýzy vybrány i buňky, které nenesou na svém povrchu CD14 antigeny, a tudíž při rozdělení na buňky CD14⁺⁺ a CD14⁺ uniknou naší pozornosti. Těmito buňkami by mohly být CD14^{dim} (CD16^{bright}, CD16⁺) monocyty, které jsou právě některými autory označovány za „autoimunitní“. Případně by těmito buňkami mohly být dendritické buňky, které jsou fyzicky podobné monocytům a na svém povrchu prezentují CD16 antigen, ale CD14 antigen neexprimují a jsou CD14 negativní (Emminger et al., 2001; Yoshioka et al., 2002; Cros et al., 2010).

Při návrhu experimentů vedoucích k optimalizaci *in vitro* kultivací jsme vycházeli z výsledků práce „Vrozená imunita a cirkulující monocyty - význam a funkce v patogenezi celiakie“ (Němečková, 2012).

Na základě těchto poznatků jsme se pokusili eliminovat co nejvíce možných aktivujících agens, která by mohla experimenty ovlivnit nežádoucí stimulací. Z tohoto důvodu došlo k obměně běžného laboratorního plastu za apyrogenní (tzv. endotoxin-free) a k výhradnímu použití chemikálií certifikovaných jako low-endotoxin. Nadměrná stimulace endotoxiny by mohla vést ke zkreslení výsledků, protože po překročení určité hranice dávky stimulantu může dojít k opačnému efektu, tedy k downregulaci sledovaných prozánětlivých markerů, případně by buňky na stimulační agens vůbec nereagovaly.

Dalším krokem byla výměna antikoagulačního činidla EDTA za citrát. Engstad et al. (1997) uvádí ve svých stimulačních experimentech právě u EDTA nejnižší buněčnou odpověď na stimulační agens.

Stimulačním agens, kterým jsme chtěli dosáhnout aktivace monocytů a indukovat

tak spuštění drah vrozené imunity, byl lipopolysacharid (LPS). Zatímco v již zmiňované práci Němečková (2012) byl použit LPS z *E. coli* 0111:B4, na základě dalších testů provedených v rámci předkládané práce se jako mnohem vhodnější jevil LPS z *E. coli* 0127:B8 (obojí od firmy Sigma-Aldrich), který je tedy používán dále.

Odstranění faktoru stresu u buněk se ukázalo být při optimalizačních experimentech pro nás jedním z klíčových bodů. Krevní buňky, které se ocitnou v jiném prostředí (vyjmutí z krevního řečiště, kde cirkulují) a také kontakt s antikoagulačními činidly logicky působí na buňky, které se brání zvýšenou produkcí cytokinů. Ačkoli mnozí autoři (de Waal Malefyt et al., 1991) ihned po odběru a separaci buňky nasazují a stimulují, jiní je nechají před stimulací „uklidnit“ a „vzpamatovat“ ze stresu zaviněného odběrem a izolací, a stimulují až po určitém čase (Henricson et al., 1995; Corrêa et al., 2011). Na základě studia literatury jsme se rozhodli pro dobu „uklidnění“ 22 hodin, která se ukázala býti dostatečná. Pro plánované dlouhodobé stimulační však takto dlouhé uklidňování monocytů bylo kontraproduktivní vzhledem k jejich rychlé diferenciací aktivitě a omezené životnosti. Bylo tedy nutné optimalizovat dobu „uklidnění“ na co nejkratší, avšak již dostačující čas pro adaptaci monocytů na *in vitro* podmínky. Testovány byly časy „uklidnění“ 3 a 8 hodin. Po 3 hodinách „uklidnění“ jsme nepozorovali zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů (TNF- α , IL-6) u buněk stimulovaných LPS, protože buňky stresované odběrem a jejich izolací z plné krve se nestačily vrátit ke své normální aktivitě a jejich reakce na stimulační podněty byly nulové.

6. Závěr

V rámci své diplomové práce jsem na základě exprese relativních hladin mRNA PRL, TLR2 a TLR4 ověřila vhodnost použití buffy coatů jako zdravých kontrol. Pro pochopení funkce nespecifické imunity v patogenezi diabetu jsem za účelem sledování předpokládaných změn chování monocytů u diabetických pacientů sledovala expresi mRNA i proteinu. Exprese *CD14*, *PRL*, *TLR2* a *TLR4* genů byla pozorována buď formou kvantifikace mRNA u monocytů, detekcí míry fluorescence antigenu na povrchu monocytů nebo stanovením zastoupení antigen-pozitivních buněk ve vzorku PBMCs izolovaných z periferní krve. Dospěla jsem k následujícím poznatkům a z nich vyplývajícím závěrům:

- Exprese mRNA PRL, TLR2 a TLR4 se významně liší mezi vzorky buffy coatů zdravých dárců krve a vzorky krve zdravých jedinců odebraných standardním způsobem do systému Vacuette®, a proto není vhodné používat buffy coaty jako zdravé kontroly.
- U pacientů s autoimunitním diabetem se exprese mRNA PRL v monocytech v porovnání ke zdravým kontrolám nemění.
- Pacienti s autoimunitním diabetem vykazují zvýšenou expresi mRNA TLR2 oproti zdravým kontrolám, na úrovni proteinu však není tento jev pozorován. Exprese mRNA TLR4 není zvýšena u pacientů s autoimunitním diabetem oproti kontrolám a to ani na úrovni proteinu, kde je dokonce ve srovnání s kontrolami nižší.
- Pacienti s autoimunitním diabetem mají oproti zdravým jedincům méně CD14⁺⁺ i CD14⁺ („zralejších“) buněk, ale na povrchu obou těchto skupin monocytů jsou detekovány významně vyšší počty CD14 molekul než u zdravých kontrol. Z toho lze usuzovat na deregulaci imunitního systému vycházející z charakteru diabetického onemocnění a to jak u diabetu autoimunitního, tak i u diabetu 2. typu.

Splněn byl také dílčí cíl této diplomové práce, neboť se pro plánovanou studii funkce mimohypofyzárního prolaktinu *in vitro* podařilo optimalizovat podmínky stimulace monocytů.

7. Seznam použitých zkratk

AD	autoimunitní diabetes
AJ	arbitrární jednotka
AMK	aminokyselina
anti-Id	anti-idiotypická protilátka
APC	antigen prezentující buňka
APC	allofykocyanin
bp	páry bází
CCL3	chemokin (C-C Motif) Ligand 3
CCR2	C-C chemokinový receptor 2. typu
CD (např. CD14)	diferenciační antigen (např. diferenciační antigen 14)
cDNA	komplementární molekula k DNA
CPD	antikoagulační činidlo obsahující citrát, fosfát a dextrózu
CpG	cytosin-fosfát-guanin
<i>CTLA-4</i>	gen pro cytotoxický T-lymfocytární antigen 4
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	dvouřetězcová ribonukleotidová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMR2	mucinu podobný receptor 2 obsahující modul epidermálního růstového faktoru
FITC	fluorescenční isothiokyanát
GAD	dekarboxyláza kyseliny glutamové
GLUT2 (4)	glukózový transportér typu 2 (4)
GPI	glykosylfosfatidylinositol
HLA-DQ/DR	hlavní lidský antigen typu DQ/DR
IA-2 (IA-2b)	tyrosinfosfatáza
IAA	inzulínová autoprotilátka
ICAs	protilátky proti ostrůvkům
IFN- γ	interferon γ
IgG	imunoglobulin G
IL-1 (6, 8, 12)	interleukin-1 (6, 8, 12)

ILT-4	imunoglobulinu podobný transkript 4
<i>INS</i>	gen pro inzulin
IRAK	IL-1 receptor asociovaná kináza
IRF-1 (3)	interferon regulující faktor 1 (3)
K	zdravá kontrolní skupina
<i>KCNJ11/ABCC8</i>	gen kódující podjednotku Kir6.2 kanálu KATP β -buněk pankreatu/ gen kódující podjednotku SUR1 kanálu KATP β -buněk pankreatu
LADA	latentní autoimunitní diabetes dospělých (LADA diabetici)
kDa	kilodaltony
kb	kilobaze
LPS	lipopolysacharid
LRR	repetitivně doména bohatá na leucin
M-CSF	kolonie stimulující faktor makrofágů
MD-2	myeloidní diferenciační protein 2
MEK	kináza mitogenem aktivované proteinkinázy
MFI	průměrná intenzita fluorescence
MODY	monogenní diabetes (maturity onset diabetes of the young)
mRNA	mediátorová ribonukleotidová kyselina
MyD88	myeloidní diferenciační faktor 88
NF- κ B	jaderný faktor κ B
NK	negativní kontrola
NOD	neobézní diabetická myš
nonDM	nediabetičtí pacienti
p56	lymfocyt-specifická protein tyrozin kinázy p56
PAMPs	molekulární struktury charakteristické pro patogeny
PBMCs	mononukleární buňky periferní krve
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	fykoeritrin
<i>PGK1</i>	gen pro fosfoglycerát kinázu 1
PIH	prolaktostatin
PPAR γ	receptor aktivující proliferaci peroxisomů

PRL	prolaktin
PRL-R	prolaktinový receptor
PRRs	struktury rozeznávající konzervované molekulární struktury charakteristické pro patogeny
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
RT	pokojová teplota
RT PCR	reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce
<i>SLC5A2</i>	gen pro sodno-glukózový kotransportér 2
SNP	jednonukleotidové polymorfismy
T1D	diabetes 1. typu (diabetici 1. typu)
T2D	diabetes 2. typu (diabetici 2. typu)
TCR	receptor T-lymfocytů pro antigen
Th1	pomocný T-lymfocyt 1
TICAM-1	Toll-like receptor adaptérová molekula 1
TIR	Toll/IL-1 receptorová doména
TLR(s)	Toll-like receptor(y)
TNF- α	faktor nekrotizující nádory α
TO	buffy coaty zdravých dárců krve
TO FNKV	Transfúzní oddělení Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
TRAF3(6)	TNF receptor asociovaný faktor 3 (6)
TRAM	translokací asociovaný membránový protein 1
TRH	tyroliberin
TRIF	TIR doménu obsahující adaptér vyvolávající INF- β
VNTR	tandemově opakované repetitivní sekvence
ZnT8	zinkový transportér 8

8. Seznam použité literatury

- Akashi S, Nagai Y, Ogata H, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Kawasaki K, Nishijima M, Hayashi S, et al. 2001. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. *Int. Immunol.* 13:1595–1599.
- Akashi-Takamura S, and Miyake K. 2006. Toll-like receptors (TLRs) and immune disorders. *J. Infect. Chemother.* 12:233–240.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl M-C, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, et al. 2000. The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 26:76–80.
- American Diabetes Association. 2012. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 35:S64–S71.
- Anděl M, Andělová K, Arenberger P, Bartáková H, Dlouhý P, Duška F, Gojišová E, Kocur I, Kraml P, et al. 2001. Diabetes mellitus a další poruchy metabolismu. Praha: Galén.
- Arden KC, Boutin J-M, Djiane J, Kelly PA, and Cavenee WK. 1990. The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenet. Genome Res.* 53:161–165.
- Atkinson M, Bowman M, Campbell L, Darrow B, Kaufman D, and Macleren N. 1994. Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest.* 94:2125–2129.
- Van der Auwera B, Van Waeyenberge C, Schuit F, Heimberg H, Vandewalle C, Gorus F, Flament J, and Registry BD. 1995. DRB1*0403 Protects Against IDDM in Caucasians With the High-Risk Heterozygous DQA1*0301-DQB1*0302/DQA1*0501-DQB1*0201 Genotype. *Diabetes* 44:527–530.
- Barzilai O, Sherer Y, Ram M, Izhaky D, Anaya JM, and Shoenfeld Y. 2007. Epstein–Barr Virus and Cytomegalovirus in Autoimmune Diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1108:567–577.
- Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR, and Segal DM. 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol.* 24:528–533.
- De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, Lombardi G, and Bellastella A. 2005. Prolactin and autoimmunity. *Pituitary* 8:25–30.
- Bergman M. 2013. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine* 43:504–513.

- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, and Kelly PA. 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways, and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19:225–268.
- Brelje TC, Parsons JA, and Sorenson RL. 1994. Regulation of islet β -cell proliferation by prolactin in rat islets. *Diabetes* 43:263–273.
- Bustin SA. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29:23–39.
- Calcinaro F, Dionisi S, Marinaro M, Candeloro P, Bonato V, Marzotti S, Corneli RB, Ferretti E, Gulino A, et al. 2005. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 48:1565–1575.
- Cejkova P, Chroma V, Cerna M, Markova M, Marek J, Lacinova Z, Haluzik M, and Cejkova RndP. 2012. Monitoring of the Course of Sepsis in Hematooncological Patients by Extrahypothalamic Prolactin Expression in Peripheral Blood Monocytes. *Physiol. Res.* 61:481–488.
- Cinek O, Koloušková S, Šnajderová M, Šumník Z, Sedláková P, Dřevínek P, Vavřínek J, and Ronningen KS. 2001. HLA class II genetic association of type 1 diabetes mellitus in Czech children. *Pediatr. Diabetes* 2:98–102.
- Clevenger CV, and Kline JB. 2001. Prolactin receptor signal transduction. *Lupus* 10:706–718.
- Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, and Martial JA. 1981. Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J. Biol. Chem.* 256:4007–4016.
- Cooper MA, Fehniger TA, and Caligiuri MA. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22:633–640.
- Coppieters KT, and von Herrath M. 2013. Antibody cross-reactivity and the viral aetiology of type 1 diabetes. *J. Pathol.* 230:1–3.
- Corrêa CR, Dias-Melicio LA, Calvi SA, Lastória S, and Soares AM. 2011. Activation of monocytes and cytokine production in patients with peripheral atherosclerosis obliterans. *J Inflamm* 29:23.
- Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang S-Y, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, et al. 2010. Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33:375–386.
- Čihák R. 2002. *Anatomie. 2.* Praha: Grada.
- Dasu MR, Devaraj S, Park S, and Jialal I. 2010. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33:861–868.

- Dean L, and McEntyre J. 2004. The Genetic Landscape of Diabetes [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1667/>
- Devaraj S, Dasu MR, Rockwood J, Winter W, Griffen SC, and Jialal I. 2008. Increased toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in monocytes from patients with type 1 diabetes: further evidence of a proinflammatory state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93:578–583.
- Díaz L, González L, Lira-Albarrán S, Larrea F, Díaz-Muñoz M, and Méndez I. 2013. Prolactin in the Immune System. Available from: <http://www.intechopen.com/books/export/citation/EndNote/prolactin/prolactin-in-the-immune-system>
- Dostál C, Moszkorzová L, Musilová L, Lacinová Z, Marek J, and Zvárová J. 2003. Serum prolactin stress values in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 62:487–488.
- Drescher KM, Kono K, Bopegamage S, Carson SD, and Tracy S. 2004. Coxsackievirus B3 infection and type 1 diabetes development in NOD mice: insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infection. *Virology* 329:381 – 394.
- Eisenbarth GS. 2007. Update in type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92:2403–2407.
- Emminger W, Zlabinger GJ, Fritsch G, and Urbanek R. 2001. CD14dim/CD16bright monocytes in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur. J. Immunol.* 31:1716–1719.
- Engstad CS, Gutteberg TJ, and Osterud B. 1997. Modulation of blood cell activation by four commonly used anticoagulants. *Thromb. Haemost.* 77:690–696.
- Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, Burrows NR, Geiss LS, Valdez R, Beckles GLA, Saaddine J, Gregg EW, et al. 2000. Type 2 diabetes among North adolescents: An epidemiologic health perspective. *J. Pediatr.* 136:664 – 672.
- Fernández-Real JM, and Pickup JC. 2008. Innate immunity, insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* 19:10–16.
- Ferrannini E. 2011. Learning from glycosuria. *Diabetes* 60:695–696.
- Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, and Ziegler-Heitbrock HW. 1993. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 82:3170–3176.
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, et al. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78–83.
- Fojtíková M, Cerná M, and Pavelka K. 2010. [A review of the effects of prolactin hormone and cytokine on the development and pathogenesis of autoimmune diseases]. *Vnitr. Lek.* 56:402–413.

- Fradin D, Le Fur S, Mille C, Naoui N, Groves C, Zelenika D, McCarthy MI, Lathrop M, and Bougneres P. 2012. Association of the CpG methylation pattern of the proximal insulin gene promoter with type 1 diabetes. *Plos One* 7.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, and Nagy G. 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80:1523–1631.
- Van Furth R, and Cohn ZA. 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128:415–435.
- Geissmann F, Manz M, Jung S, Sieweke M, Merad M, and Ley K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* vol. 327:656–661.
- Geissmann F. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* vol. 327:656–661.
- Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, and DiMattia GE. 1994. Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol. Endocrinol.* 8:356–373.
- Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, et al. 2003. Large-Scale Association Studies of Variants in Genes Encoding the Pancreatic β -Cell KATP Channel Subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) Confirm That the KCNJ11 E23K Variant Is Associated With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 52:568–572.
- Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, and Martial JA. 1996. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocr. Rev.* 17:385–410.
- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, et al. 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 38:320–323.
- Greenberg AS, and McDaniel ML. 2002. Identifying the links between obesity, insulin resistance and β -cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur. J. Clin. Invest.* 32:24–34.
- Hashimoto C, Hudson KL, and Anderson KV. 1988. The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269–279.
- Heine GH, Ortiz A, Massy ZA, Lindholm B, Wiecek A, Martínez-Castelao A, Covic A, Goldsmith D, Süleymanlar G, et al. 2012. Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 8:362–369.
- Henricson BE, Carboni JM, Burkhardt AL, and Vogel SN. 1995. LPS and Taxol activate Lyn kinase autophosphorylation in Lps (n), but not in Lpsd), macrophages. *Mol. Med.* 1:428.

- Holstad M, and Sandler S. 1999. Prolactin protects against diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *J. Endocrinol.* 163:229–234.
- Hořejší V, and Bartůňková J. 2009. *Základy imunologie*. 4. vyd. Triton.
- Jacobi AM, Rohde W, Volk HD, Dörner T, Burmester GR, and Hiepe F. 2001. Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. *Ann. Rheum. Dis.* 60:242–247.
- Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Huber M, Kalis C, Keck S, et al. 2005. CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat. Immunol.* 6:565–570.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, and Steinmetz RW. 1996. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* 17:639–669.
- Kato N. 2013. Insights into the genetic basis of type 2 diabetes. *J. Diabetes Investig.* 4:233–244.
- Kobayashi M, Saitoh S, Tanimura N, Takahashi K, Kawasaki K, Nishijima M, Fujimoto Y, Fukase K, Akashi-Takamura S, et al. 2006. Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J. Immunol.* 176:6211–6218.
- Kobe B, and Kajava AV. 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11:725–732.
- Kršek M. 2011. *Endokrinologie*. cGalén.
- Larsson H, Jonsson I, Lernmar A, Ivarsson S, Radtke J, and Hampe C. 2013. Decline in titers of anti-idiotypic antibodies specific to autoantibodies to GAD65 (GAD65Ab) precedes development of GAD65Ab and type 1 diabetes. *Plos One* vol. 8:e65173–e65173.
- Le TN, Elsea SH, Romero R, Chaiworapongsa T, and Francis GL. 2013. Prolactin Receptor Gene Polymorphisms Are Associated with Gestational Diabetes. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 17:567–571.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, and Hoffmann JA. 1996. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 86:973–983.
- Li C, Dixon J, Lo T, Pankov Y, and Schmidt K. 1969. Amino-acid sequence of ovine lactogenic hormone. *Nature* 224:695–&.
- Lucassen A, Julier C, Beressi J, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, and Bell J. 1993. Susceptibility to insulin-dependent diabetes-mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nat. Genet.* 4:305–310.
- Male D, Brostoff J, Roth D, and Roitt I. 2006. *Immunology*. 7th ed. Mosby.

- Matalka KZ. 2003. Prolactin enhances production of interferon- γ , interleukin-12, and interleukin-10, but not of tumor necrosis factor- α , in a stimulus-specific manner. *Cytokine* 21:187–194.
- Matera L, Mori M, Geuna M, Buttiglieri S, and Palestro G. 2000. Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. *J. Neuroimmunol.* 109:47–55.
- McGettrick AF, and O'Neill LA. 2004. The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol. Immunol.* 41:577–582.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, and Janeway CA. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394–397.
- Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135–145.
- Min D, Brooks B, Wong J, Salomon R, Bao W, Harrisberg B, Twigg SM, Yue DK, and McLennan SV. 2012. Alterations in Monocyte CD16 in Association with Diabetes Complications. *Mediators Inflamm.* 2012:10.
- Mohammad MK, Morran M, Slotterbeck B, Leaman DW, Sun Y, von Grafenstein H, Hong S-C, and McInerney MF. 2006. Dysregulated Toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Int. Immunol.* 18:1101–1113.
- Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyk A, Kowal K, Lenczewska D, and Dabrowska M. 2009. Enhanced frequencies of CD14⁺⁺ CD16⁺, but not CD14⁺ CD16⁺, peripheral blood monocytes in severe asthmatic patients. *Clin. Immunol.* 130:338–346.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, et al. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* 164:5998–6004.
- Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, et al. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3:667–672.
- Nagy E, and Berczi I. 1991. Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinology* 128:2776–2784.
- NCBI. 2013a. HLA II. class. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/gene/3117>
- NCBI. 2013b. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/gene/1493>
- NCBI. 2013c. Prolactin gene. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.is.cuni.cz/gene/5617>

- Němečková I. 2012. Vrozená imunita a cirkulující monocyty - význam a funkce v patogenezi celiakie.
- Nervi S, Atlan-Gepner C, Kahn-Perles B, Lecine P, Vialettes B, Imbert J, and Naquet P. 2000. Specific Deficiency of p56lck Expression in T Lymphocytes from Type 1 Diabetic Patients. *J. Immunol.* 165:5874–5883.
- Nockher WA, and Scherberich JE. 1998. Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis. *Infect. Immun.* 66:2782–2790.
- Oganesyan G, Saha S, Guo B, He J, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, and Cheng G. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* vol. 439:208–11.
- Palmer JP, Asplin CM, Clemons P, Lyen K, Tatpati O, Raghu PK, and Paquette TL. 1983. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science* 222:1337–1339.
- Park Y, Hong S, Park L, Woo J, Baik S, Nam M, Lee K, Kim Y, and Group and on behalf of TK collaboratory. 2011. LADA prevalence estimation and insulin dependency during follow-up. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 27:975–979.
- Parsons JA, Brelje TC, and Sorenson RL. 1992. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* 130:1459–1466.
- Patiño R, Ibarra J, Rodriguez A, Yagüe MR, Pintor E, Fernandez-Cruz A, and Figueredo A. 2000. Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am. J. Cardiol.* 85:1288–1291.
- Perušičová J. 2011. Studie MOTUDI – ovlivnění hmotnosti inzulinovou léčbou u nemocných s DM2 v ČR. *Interní Medicína Praxi* [Internet] 13. Available from: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/09/11.pdf>
- Pickup JC, and Crook MA. 1998. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41:1241–1248.
- Pickup JC. 2004. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:813–823.
- Pietropaolo M, Towns R, and Eisenbarth GS. 2012. Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* [Internet] 2. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/10/a012831.abstract>
- Průša R. 2006. Diabetes mellitus a jeho molekulárně genetická podstata. *Klin. Biochem. Metab. Časopis České Společnosti Klin. Biochem.* 14/35:5–7.

- Pugin J, Stern-Voeffray S, Daubeuf B, Matthay MA, Elson G, and Dunn-Siegrist I. 2004. Soluble MD-2 activity in plasma from patients with severe sepsis and septic shock. *Blood* 104:4071–4079.
- Pugliese A, Kawasaki E, Zeller M, Yu LP, Babu S, Solimena M, Moraes CT, Pietropaolo M, Friday RP, et al. 1999. Sequence analysis of the diabetes-protective human leukocyte antigen-DQB1*0602 allele in unaffected, islet cell antibody-positive first degree relatives and in rare patients with type 1 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:1722–1728.
- Ramondetti F, Sacco S, Comelli M, Bruno G, Falorni A, Iannilli A, d' Annunzio G, Iafusco D, Songini M, et al. 2012. Type 1 diabetes and measles, mumps and rubella childhood infections within the Italian Insulin-dependent Diabetes Registry. *Diabet. Med.* 29:761–766.
- Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, and Reid CDL. 1999. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29:2769–2778.
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, et al. 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180:83–93.
- Santer R, Kinner M, Lassen CL, Schneppenheim R, Eggert P, Bald M, Brodehl J, Daschner M, Ehrich JHH, et al. 2003. Molecular Analysis of the SGLT2 Gene in Patients with Renal Glucosuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14:2873–2882.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, and Rietschel ET. 1995. Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Arch. Microbiol.* 164:383–389.
- Silbernagl S, and Despopoulos A. 2004. Atlas fyziologie člověka. Vyd. 3. české. Grada.
- Sinha YN. 1995. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr. Rev.* 16:354–369.
- Skrzeczyńska-Moncznik J, Bzowska M, Grage-Griebenow E, Zembala M, and Pryjma J. 2008. Peripheral Blood CD14^{high} CD16⁺ Monocytes are Main Producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* 67:152–159.
- Smith CR, and Norman MR. 1990. Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann. Clin. Biochem.* 27:542.
- Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, and Pfeiffer AF. 2003. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52:812–817.
- Springer SC, Silverstein J, Copeland K, Moore KR, Prazar GE, Raymer T, Shiffman RN, Thaker VV, Anderson M, et al. 2013. Management of Type 2 Diabetes Mellitus in Children and Adolescents. *Pediatrics* 131:e648–e664.

- Stastny P, Ball E, Khan M, Olsen N, Pincus T, and Gao X. 1988. HLA-DR4 and Other Genetic-Markers in Rheumatoid-Arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 27:132–138.
- Steinman RM, and Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142–1162.
- Stern L, Brown J, Jardetzky T, Gorga J, Urban R, Strominger J, and Wiley D. 1994. Crystal-Structure of the Human Class-II MHC Protein HLA-DR1 Complexed with an Influenza-Virus Peptide. *Nature* 368:215–221.
- Strauss-Ayali D, Conrad SM, and Mosser DM. 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J. Leukoc. Biol.* 82:244–252.
- Ströher U, West E, Bugany H, Klenk H-D, Schnittler H-J, and Feldmann H. 2001. Infection and Activation of Monocytes by Marburg and Ebola Viruses. *J. Virol.* 75:11025–11033.
- Szaflarska A, Baj-Krzyworzeka M, Siedlar M, Węglarczyk K, Ruggiero I, Hajto B, and Zembala M. 2004. Antitumor response of CD14+/CD16+ monocyte subpopulation. *Exp. Hematol.* 32:748–755.
- Szopa T, Titchener P, Portwood N, and Taylor K. 1993. Diabetes-Mellitus Due to Viruses - Some Recent Developments. *Diabetologia* 36:687–695.
- Takeda K, Kaisho T, and Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335–376.
- Tisch R, and McDevitt H. 1996. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 85:291–297.
- Todd J, Bell J, and McDevitt H. 1987. HLA-DQ-Beta Gene Contributes to Susceptibility and Resistance to Insulin-Dependent Diabetes-Mellitus. *Nature* 329:599–604.
- Tracy S, Drescher KM, and Chapman NM. 2011. Enteroviruses and type 1 diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 27:820–823.
- Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, and Martial JA. 1984. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *Embo J.* 3:429.
- Tuomi T, Groop L, Zimmet P, Rowley P, Knowles W, and Mackay I. 1993. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulindependent onset of disease. *Diabetes* 42:359–362.
- Ueda E, Ozerdem U, Chen Y-H, Yao M, Huang KT, Sun H, Martins-Green M, Bartolini P, and Walker AM. 2006. A molecular mimic demonstrates that phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone. *Endocr. Relat. Cancer* 13:95–111.
- Ulevitch RJ, and Tobias PS. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 13:437–457.

- Vera-Lastra O, Jara LJ, and Espinoza LR. 2002. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 1:360–364.
- Viriyakosol S, Tobias PS, Kitchens RL, and Kirkland TN. 2001. MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 276:38044–38051.
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, and de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174:1209–1220.
- Wadhwa M, Seghatchian MJ, Dilger P, Contreras M, and Thorpe R. 2000. Cytokine accumulation in stored red cell concentrates: effect of buffy-coat removal and leucoreduction. *Transfus. Sci.* 23:7–16.
- Wasmuth HE, and Kolb H. 2000. Cow's milk and immune-mediated diabetes. *Proc. Nutr. Soc.* 59:573–579.
- Weiner LM, Li W, Holmes M, Catalano RB, Dovnarsky M, Padavic K, and Alpaugh RK. 1994. Phase I trial of recombinant macrophage colony-stimulating factor and recombinant γ -interferon: toxicity, monocytosis, and clinical effects. *Cancer Res.* 54:4084–4090.
- Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, et al. 2008. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 455:1109–1113.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, and Akira S. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4:1144–1150.
- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, and Akira S. 2002. Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- β Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling. *J. Immunol.* 169:6668–6672.
- Yoshioka Y, Ohwada A, Harada N, Satoh N, Sakuraba S, Dambara T, and Fukuchi Y. 2002. Increased circulating CD16⁺ CD14^{dim} monocytes in a patient with pulmonary alveolar proteinosis. *Respirology* 7:273–279.
- Yu-Lee L. 2001. Stimulation of interferon regulatory factor-1 by prolactin. *Lupus* 10:691–699.
- Ziegler-Heitbrock L. 2007. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes. *J. Leukoc. Biol.* vol. 81:584–592.
- Ziegler-Heitbrock L. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* vol. 116:e74–e80.

- Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, and Lang DA. 1994. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet. Med.* 11:299–303.
- Zvolský M. 2013. Činnost oboru diabetologie, péče o diabetiky v roce 2012. Available from: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/cinnost-oboru-diabetologie-pece-diabetiky-roce-2012>